

LEONEL RICARDO CURCIO JUNIOR

**O PAPEL DO HPV NAS LESÕES CITOLÓGICAS DE
BAIXO GRAU:
CORRELAÇÃO ENTRE TIPO E CARGA VIRAL, DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E
GRAVIDADE DAS LESÕES COLPOSCÓPICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação do Departamento de Tocoginecologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho

CURITIBA

2000

Curcio Junior, Leonel Ricardo

O papel do HPV nas lesões citológicas de baixo grau: correlação entre tipo e carga viral, dados epidemiológicos e gravidade das lesões colposcópicas. Curitiba, 2000.

127 f.; 30 cm.

Orientador: Newton Sérgio de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Papillomavirus humano. 2. Colposcopia. 3. Neoplasias do colo uterino. 4. Hibridização de ácido nucléico.

Não basta a leitura sem a unção, não basta a especulação sem a devoção, não basta a pesquisa sem maravilhar-se, não basta a circunspecção sem o júbilo, o trabalho sem a piedade, a ciência sem a caridade, a inteligência sem a humildade e o estudo sem a graça.

S. Boaventura, 1268

À minha família, mesmo aos que já se foram deixando saudades em nossos corações.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rosires Pereira de Andrade, coordenador do curso de Pós-Graduação em nível de Mestrado, cujo esforço e determinação foi um dos que muito contribuiu para a realização da pós graduação no Departamento de Tocoginecologia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, que seguramente vem mudando os rumos e o perfil acadêmico e científico deste Departamento.

Ao Prof. José Soria Arrabal e Prof. Dra. Claudete Reggiani Mello, chefe e vice, respectivamente, do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná, que com entusiasmo nos apoiaram irrestritamente na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Anibal Faúndes que com experiência e sabedoria bem soube transmitir o espírito científico.

Ao Prof. Dr. Juarez Gabardo, um novo amigo, cuja amizade nasceu no transcorrer deste trabalho, nos estimulando, orientando e que muito nos ajudou do ponto de vista estatístico.

Aos amigos e parceiros da pós graduação, que constantemente nos estimularam frente a novos desafios.

Agradecimento especial ao caro amigo Prof. Dr. Newton Sergio de Carvalho, meu orientador, que foi incansável no apoio e na crítica durante todo o transcorrer deste trabalho.

À minha família, pela compreensão, carinho e paciência.

Às pacientes que conscientemente concordaram participar deste estudo, sem as quais, teria sido impossível a sua realização.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
4 SUJEITOS E MÉTODOS	55
4.1 DESENHO DO ESTUDO	55
4.2 CRITÉRIOS E PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DOS CASOS	56
4.3 CRITÉRIOS PARA COLETA DA CITOLOGIA ONCÓTICA	56
4.4 CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO CITOLÓGICA	58
4.5 CRITÉRIOS PARA COLETA DA CAPTURA HÍBRIDA	61
4.6 CRITÉRIOS PARA TIPIFICAR E QUANTIFICAR O DNA DO HPV POR CAPTURA HÍBRIDA EM MICRO-PLACA	62
4.7 CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO COLPOSCÓPICA	65
4.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS	69

4.9 CRITÉRIOS DE COMPARAÇÃO ENTRE TIPO VIRAL E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS	70
4.10 CRITÉRIOS DE COMPARAÇÃO ENTRE TIPO, QUANTIDADE VIRAL E GRAVIDADE DAS LESÕES COLPOSCÓPICAS	70
4.11 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	71
5 RESULTADOS	72
5.1 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL EM MULHERES COM CITOLOGIA ONCÓTICA DE BAIXO GRAU	72
5.2 COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS VIRAIS E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS ...	73
5.3 TIPO E MÉDIA DA QUANTIDADE VIRAL OBSERVADA NA AMOSTRA	78
5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS TIPOS VIRAIS E O ÍNDICE DE GRAVIDADE COLPOSCÓPICO SIMPLIFICADO (ÍNDICE DE GRAVIDADE)	79
5.5 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS ÍNDICES COLPOSCÓPICOS RELATIVOS AOS TIPOS VIRAIS ENCONTRADOS NA AMOSTRA	87
6 DISCUSSÃO	89
7 CONCLUSÕES	106
ANEXOS	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE TABELAS

1	PREVALÊNCIA DA POSITIVIDADE DO TIPO VIRAL DE HPV PESQUISADO POR CAPTURA HÍBRIDA EM MICRO-PLACA EM MULHERES COM CITOLOGIA ONCÓTICA DE BAIXO GRAU	72
2	DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO RELACIONANDO-SE COM A IDADE	73
3	DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO À PARIDADE	74
4	DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO RELACIONANDO-SE COM O NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAIS	75
5	DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO AO HÁBITO DE FUMAR	76
6	DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO AO MÉTODO ANTICONCEPCIONAL UTILIZADO	77

7	DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO À IDADE DO PRIMEIRO COITO	78
8	MÉDIA E DESVIO PADRÃO RELATIVO À CARGA VIRAL DOS TIPOS NÃO ONCOGÊNICOS E ONCOGÊNICOS DOS QUATRO GRUPOS CONSIDERADOS	79
9	NÚMERO DE CASOS COM O RESPECTIVO ÍNDICE COLPOSCÓPICO DOS TIPOS VIRAIS	80
10	NÚMERO DE CASOS COM AS RESPECTIVAS MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DA CARGA VIRAL (CV) DE VÍRUS DO TIPO NÃO ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES ÍNDICES COLPOSCÓPICOS	82
11	NÚMERO DE CASOS COM AS RESPECTIVAS MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DA CARGA VIRAL (CV) DE VÍRUS DO TIPO ONCOGÊNICO PARA OS DIFERENTES ÍNDICES COLPOSCÓPICOS	84
12	ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS ÍNDICES COLPOSCÓPICOS RELATIVOS AOS QUATRO GRUPOS CLASSIFICADOS DE ACORDO COM OS TIPOS DE VÍRUS ENCONTRADOS NA AMOSTRA	88
13	COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS MÉTODOS UTILIZADOS NA DETECÇÃO DO DNA-HPV	90
14	ANÁLISE COMPARATIVA DA SENSIBILIDADE DA METODOLOGIA DE CAPTURA HÍBRIDA EM RELAÇÃO À CITOLOGIA ONCÓTICA NA DETECÇÃO DO HPV, SEGUNDO VÁRIOS AUTORES	92

15 ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DA PREVALÊNCIA DE HPV ONCOGÊNICO EM LESÕES CITOLÓGICAS DE BAIXO GRAU, SEGUNDO VÁRIOS AUTORES	95
16 COMPARAÇÃO DOS TIPOS VIRAIS COM AS RESPECTIVAS MÉDIAS DE CARGAS VIRAIS	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGUS	- Alteração Glandular de Significado Indeterminado
AIDS	- Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
ASCUS	- Alteração Escamosa de Significado Indeterminado
CEL.	- Célula
CH	- Captura Híbrida
CV	- Carga Viral
C.V.	- Coeficiente de variação do experimento
DIU	- Dispositivo Intra Uterino
DNA	- Acido Desoxi-ribonucléico
DT	- Dot Blot
E	- Early (precoce)
E1	- Oncoproteína 1
E2	- Oncoproteína 2
E6	- Oncoproteína 6
E7	- Oncoproteína 7
F	- Teste F de Snedecor
FISH	- Hibridização in situ com filtro
FV	- Fator de Variação
GL	- Graus de Liberdade
HPV	- Papiloma Vírus Humano
HSIL	- Lesão escamosa da alto grau
IC	- Intervalo de Confiança
IGCS	- Índice de Gravidade Colposcópica
IFCPC	- Internacional Federative for Cervical Pathology and Colposcopy

INCA	- Instituto Nacional do Câncer
ISH	- Hibridização in situ
L	- Late (Tardio)
LCR	- Long Control Region (Região de Controle Longo)
LSIL	- Lesão escamosa de baixo grau
ml	- Mililitro
n	- Número da Amostra
NIC	- Neoplasia Intra-epitelial Cervical
OR	- Odd Ration
OMS	- Organização Mundial de Saúde
p.	- Página
P53	- Proteína Supressora de Tumor 53
PCA	- Tipo Viral não Oncogênico
PCB	- Tipo Viral Oncogênico
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
Pg/ml	- Picograma por Mililitro
POLI-D-LISINA	- Poli- Destrogera-Lisina
POLI-L-LISINA	- Poli-Levogera-Lisina
QM	- Quadrado Médio
RB	- Proteína Supressora de Tumor
RLU	- Unidade de Luz Relativa
RNA	- Ácido Ribonucléico
RR	- Risco Relativo
SQ	- Soma dos Quadrados
SB	- Southern Blot
"t"	- Teste Estatístico "t" de Student
=	- Igual
≥	- Maior ou Igual
≤	- Menor ou igual
%	- Porcentagem

RESUMO

Tem sido demonstrado que a infecção pelo Papiloma vírus humano representa o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical. Atualmente é consenso que em torno de mais de 90% das neoplasias cervicais podem ser associadas a certos tipos virais. Entretanto, o HPV não é causa suficiente para malignidade, havendo necessidade de certos co-fatores para que uma percentagem de infecção HPV persistente eventualmente progrida para o câncer. Objetivamos determinar a prevalência dos tipos virais de HPV em mulheres que apresentavam citologias oncológicas de baixo grau. Avaliar a relação dos tipos virais de HPV com variáveis epidemiológicas, assim como os tipos virais e suas respectivas quantidades com os achados colposcópicos. Foram estudadas 130 mulheres que apresentavam citologia oncológica considerada de baixo grau, excluídas as que apresentavam laudo de ASCUS e AGUS. A tipificação e quantificação viral foi realizada através da captura híbrida em micro-placa. Todas as mulheres foram submetidas à avaliação colposcópica, tendo sido criado para o estudo o índice colposcópico simplificado (índice de gravidade). Encontrou-se uma alta prevalência de vírus do tipo oncogênico, 37 casos (28,5%), e da associação não oncogênica/oncogênica 80 casos (61,5%). Não encontramos correlação entre os tipos virais e as variáveis epidemiológicas. Ao compararmos os tipos virais com os índices colposcópicos, não foi observada correlação entre o índice colposcópico e o aumento da média da carga viral não oncogênica, entretanto, encontramos uma relação direta entre o índice colposcópico e o aumento da média da carga viral do tipo oncogênico. Em relação ao comportamento do vírus tipo oncogênico observamos ser este independente quando da associação com tipos virais não oncogênicos. Concluímos ser alta a prevalência do HPV tipo oncogênico e associação não oncogênica/oncogênica em pacientes com citologia oncológica de baixo grau, havendo uma relação direta entre a quantidade da carga viral do tipo oncogênico com a gravidade da lesão colposcópica, sendo o comportamento do vírus tipo oncogênico independente da associação com outro tipo viral.

ABSTRACT

It has been shown that infections by Human Papilloma Virus (HPV) are considered the highest risk factor to development of cervical cancer. Nowadays it's known that more than 90% of the cervical cancer can be associated to certain virus types. However, the HPV isn't the sufficient cause to take to a malignity status, it's needed some other co-factors so that a percentage of persistent HPV infection leads to cancer. We tried to set the prevalence of the several HPV types in women with low-grade squamous intraepithelial lesion cytology. Evaluations have been done over the correlation of the several HPV types with epidemiological variables, as well as the virus type and their respective viral load with colposcopic findings. Over 130 women with low squamous intraepithelial lesions were seen, excluded the ones who presented ASCUS and AGUS. The viral typing and quantification were obtained through a Hybrid Capture on a micro plate technique. All the patients have been through colposcopic evaluations, in which have been used The Simplified Gravity Colposcopic Index (gravity index). It was found a high prevalence of oncogenic types, 37 cases (28,5%), and from the non-oncogenic/ oncogenic association 80 cases (61,5%). No correlation between the virus types and the epidemiological variables were detected. As we compared the viruses types to the colposcopic index, it was not registered a correlation between the colposcopic index and the increasing of the non-oncogenic average loads virus types, however, it was detected a direct correlation between the colposcopic index and the increase of oncogenic average loads virus types. According to the oncogenic virus type behavior, we checked that this is independent to the association to non-oncogenic virus types. We concluded that, the prevalence of oncogenic HPV types and the association with non-oncogenic/oncogenic is high in patients with low grade squamous intraepithelial lesions. There is a direct relation between the oncogenic types and the evolution of colposcopic lesion, once the oncogenic virus type is independent to the association to another virus types.

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical permanece como um dos grandes problemas de saúde pública no mundo, atingindo aproximadamente 465.500 mulheres por ano, sendo considerado o câncer mais comum em mulheres na maior parte da África, América do Sul e Central, Sudeste da Ásia e outros países em desenvolvimento (MORRIS; SCHOTTENFELD; HONG, 1996).

No Brasil, o câncer do colo uterino ocupa o segundo lugar em mortalidade, só sendo ultrapassado pelo carcinoma de mama. A estimativa de mortalidade e casos novos do Instituto Nacional do Câncer para o ano 2000, em todo o país, são de 3.625 e 17.251 respectivamente. O que corresponde à taxa bruta de 4,25/100.000 mulheres e 20,48/100.000 mulheres respectivamente (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

A maior mortalidade por carcinoma de colo uterino observada nos países menos desenvolvidos, incluindo o Brasil, deve-se em grande parte ao diagnóstico tardio da doença.

Até fins do século passado, o câncer do colo uterino só era diagnosticado nos estádios clínicos avançados. À WILLIAMS (1886), citado por MARCOS (1997), é atribuída a primeira descrição citológica de atipia epitelial não invasora. Acreditava-se que essas lesões eram carcinomas invasores nas formas iniciais, denominados de

carcinoma intra epitelial, e para descrevê-las, RUBIN (1918), citado por MARCOS (1997), introduziu o termo carcinoma “in situ”.

Hans HINSELMANN, citado por BURGHARDT (1991b), em 1925, desenvolveu o colposcópio como forma de responder à necessidade de observar e documentar as lesões do colo uterino.

Inicialmente foi desenvolvido um equipamento simples, constituído de uma lupa composta, com aumento de 10 vezes e um sistema de iluminação próprio, de tal modo que o foco da luz incidisse sobre o objeto a ser examinado.

Hinselmann acreditava que as lesões da cérvix uterina, então chamadas de “leuckoplakia”, evoluíam para câncer invasor, o que o levou a afirmar: “Não há caso de leukoplakia da portio que não venha a ser câncer”. Pertencem a Hans Hinselmann as primeiras correlações entre os achados colposcópicos e a histologia das lesões precursoras do carcinoma do colo uterino, chamadas de epitélio atípico (HINSELMANN citado por BURGHARDT, 1991b).

Schiller, em 1928, idealizou o teste com a solução iodo-iodetada, que leva seu nome. Esse teste baseia-se na reação histoquímica do iodo com o glicogênio celular. Os epitélios desprovidos de glicogênio não se impregnam com a solução de Schiller, sendo considerados anormais ou atípicos. Esse teste foi incorporado à colposcopia e considerado um grande avanço na prevenção do câncer na época (BURGHARDT, 1991b).

Outro avanço significativo na prevenção do câncer do colo uterino se dá com a publicação da clássica monografia de PAPANICOLAOU & TRAUT em 1943. Esse método que consiste na interpretação das alterações morfológicas e citoquímicas das

células, oriundas do colo uterino, através de esfregaço, revolucionou o diagnóstico precoce do câncer cervical, difundindo-se rapidamente não só nos países Anglo-Saxões, mas em toda Europa após a Segunda Guerra Mundial e progressivamente no resto do mundo.

A classificação de Papanicolaou em cinco classes marcou época na história do citodiagnóstico, foi criticada e caiu em desuso por falta de precisão diagnóstica, pois não permitia equivalência entre as classes e a terminologia histológica. Não promovia o diagnóstico das entidades não cancerosas, permitindo o estabelecimento de graduações intermediárias nas situações limítrofes (AYALA, 1978). Pela falta de unanimidade de graus utilizada pelos citologistas, que levava ao clínico a sensação de insegurança, foi sendo progressivamente modificada por recomendação da Academia Internacional de Citologia (NATIONAL CANCER INSTITUTE WORKSHOP, 1989; THE 1991 BETHESDA WORKSHOP REPORT, 1992; KURMAN; SOLOMON, 1997).

Anos mais tarde, REAGAN; HICKS (1953a e b, 1955) reconhecem o diferente potencial biológico de cancerização das distintas lesões precursoras, introduzem o termo “displasia” e elaboram uma classificação baseada nos graus histológicos: displasias leves, moderadas, acentuadas e carcinoma “in situ”.

O seguimento das pacientes portadoras de displasias em seus diferentes graus histológicos, demonstrou um distinto comportamento biológico de regressão, persistência ou progressão para o câncer do colo uterino. Observou-se que, em torno de 15% dos carcinomas de colo uterino, desenvolviam-se exclusivamente no canal endocervical, fora da área de alcance do colposcópio, e que, por sua vez, a citologia oncológica também tinha as suas limitações com proporções não desprezíveis de casos

com resultados falso-negativos. Tendo isso ocorrido, passou-se a utilizar a associação dos métodos, o que permitiu obter melhores resultados no diagnóstico precoce do câncer do colo uterino (BAJARDI et al., 1959).

Vários autores como NAVRATIL et al. (1958); MESTWERDT; WESPI (1974); e BURGHARDT (1991a e b), passaram a utilizar rotineiramente a associação da citologia e da colposcopia no diagnóstico precoce do carcinoma do colo uterino.

Permanecia um problema a ser resolvido, o da nomenclatura e da classificação colposcópica. Entende-se por nomenclatura a tradução da imagem observada em um termo que permita correlacionar-se com o significado histológico da lesão. Classificação, entendida como o enquadramento dos termos que definem os diversos aspectos colposcópicos em grupos homogêneos do ponto de vista biológico, e o seu presumível significado histológico e clínico.

Até hoje foram propostas muitas classificações dos diversos achados colposcópicos. A classificação alemã foi a matriz das terminologias utilizadas em todas as classificações, até as atuais. Descreveu e codificou os vários aspectos colposcópicos. As demais tiraram a terminologia de base, modificando os termos, introduzindo novos, na tentativa de melhor capacidade interpretativa.

Em outubro de 1975, no II CONGRESSO MUNDIAL DE PATOLOGIA CERVICAL E COLPOSCOPIA, o Comitê para Nomenclatura da International Federative for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC) publicou a Classificação Internacional. Em 1990, esse mesmo Comitê reunido em Roma, no VII CONGRESSO MUNDIAL DE PATOLOGIA CERVICAL E COLPOSCOPIA, publicou a nova classificação que vigora até os dias atuais.

RICHART (1967a e b, 1987), propôs utilizar o termo “neoplasia intra-epitelial cervical” (NIC) em substituição ao “epitélio atípico” de Hinselmann e às “Displasias” de Reagan, popularizando a teoria da “Doença Contínua”, de displasia leve a câncer invasor.

Até então, não era conhecida a etiologia do carcinoma da cérvix uterina.

MARTINEZ (1969), GRAHAN et al. (1979), observaram que o câncer da cervix uterina ocorria com maior frequência do que o esperado em mulheres cujos parceiros sexuais apresentavam câncer de pênis, e que este fato poderia ser atribuído a um fator etiológico comum. Na lista de fatores transmissíveis na etiologia do câncer cervical, estavam agentes infecciosos como *Treponema Pallidum* (LEVIN; KRESS; GOLDSTEIN, 1942), *Trichomonas vaginalis* (PATTEN; HUGHES; REAGAN, 1963), *Chlamydia Trachomatis* (PAAVONEN et al., 1979), agentes bioquímicos como o esmegma (HEINS Jr. ; DENNIS; PRATT-THOMAS, 1958) e o sêmen (SINGER; REID, 1979) e agentes virais principalmente o Herpes vírus (NAHMIAS; NAIB; JOSEF, 1974) e o Papiloma Vírus Humano (ZÜR HAUSEN, 1977).

Somente na década de 70 as atenções foram voltadas para o Papiloma Vírus Humano (HPV).

Há mais de um século o dermatologista francês GÉMY (1893), citado por ORIEL (1997), sugeriu que o condiloma acuminado poderia ter a mesma origem das verrugas genitais. Pesquisas nesse sentido foram desenvolvidas até que CIUFFO em 1907, citado por ORIEL (1997), com a auto-inoculação de extrato filtrado de verrugas de pele, obteve a reprodução destas, sugerindo a etiologia viral. A inoculação de extrato filtrado de verrugas de pele em região genital seguiu-se ao desenvolvimento de verrugas

genitais. Esse fato foi suficiente para convencer os pesquisadores de que as verrugas de pele, como as verrugas genitais, eram causadas pelo mesmo agente etiológico. Sendo assim, foi postulada a “Teoria Unitária” (STRAUSS et al., 1949; ORIEL, 1971), que confirmou a origem viral, ao demonstrar partículas virais em extrato de verrugas palmares e plantares por microscopia de elétrons; que também fora confirmada em verrugas anogenitais (ALMEIDA; ORIEL; STANNARD, 1969).

Até 1976, os condilomas exofíticos (verrugas genitais) eram considerados como a única expressão da infecção do HPV na esfera genital.

Conhecido desde a Antiguidade, o Papiloma Vírus Humano (HPV) só despertou o interesse dos pesquisadores após a descrição dos condilomas sub-clínicos por MEISELS; FORTIN (1976), PUROLA; SAVIA (1977), e dos condilomas planos por MEISELS; FORTIN; ROY (1977), MEISELS et al. (1981), MEISELS; MORIN (1981), que correlacionaram os efeitos citopatogênicos ao vírus HPV.

O interesse pelo HPV nos estudos do câncer da cervix uterina, se deu pela observação da similaridade microscópica entre as lesões pré-carcinomatosas e os condilomas acuminados. Houve dificuldades técnicas para desenvolver estudos desse tema pois, o papilomavírus não se desenvolvia em cultura de células. A “Teoria Unitária” a qual foi aceita por alguns anos, foi descartada e teve início a moderna era de estudo da infecção do HPV.

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular na década de 80, descobriu-se que existiam muitos tipos virais, e que alguns deles eram repetidamente encontrados em certas localizações e lesões, tais como: HPV 1-4 em verrugas de pele, HPV 6-11 em verrugas anogenitais e HPV 16-18 e alguns outros em lesões intra-

epiteliais cervicais e câncer do trato genital (GISSMANN; PFISTER; ZÜR HAUSEN, 1977; BERGERON et al., 1992).

Desta forma cresceram as observações e publicações, que deram fortes evidências de que o carcinoma cervical e as lesões precursoras são etiologicamente relacionadas com o HPV. O diagnóstico da infecção genital causada pelo HPV, até então, baseava-se nos achados clínicos, nas interpretações dos efeitos citopáticos sobre as células do colo uterino e a morfologia destas, através da citologia oncótica de Papanicolaou ou do estudo histológico. Todavia, esses métodos diagnósticos são incapazes de diagnosticar a infecção latente ou detectar os antígenos DNA viróticos das células infectadas (WRIGHT; SUN; KOULOS, 1995). Por estudos de hibridização molecular, o DNA do vírus HPV pode ser consistentemente detectado em mais de 90% dos carcinomas da cervix uterina e lesões precursoras. Contudo, permanecia um problema a ser resolvido, que era o de chegar a um consenso quanto a uma terminologia uniforme que retratasse as reais alterações citológicas.

A classificação de Papanicolaou que teve seu valor histórico, não permitia um adequado entendimento das neoplasias cervicais, assim como não estabelecia o diagnóstico de entidades não cancerosas. As posteriores subdivisões das lesões intra-epiteliais em displasias leves, moderadas, acentuadas e carcinomas “in situ”, não levaram em consideração a unidade da doença, as quais representam um contínuo das alterações morfológicas (GROSS; VON KROGH, 1976). Esse fato, foi melhor respondido com o conceito de “Neoplasia Intraepitelial Cervical” (NIC) (RICHART, 1967 e 1990), embora o termo “neoplasia” não seja adequado para lesões nas quais não exista tumor.

Em dezembro de 1988, na cidade de Bethesda, patrocinado pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, houve um simpósio de citologistas e citopatologistas com o intuito de produzir uma terminologia uniforme de diagnóstico citológico, que facilitasse a comunicação entre o laboratório e o médico, tivesse uma correlação cito-histológica e permitisse a pesquisa dos aspectos epidemiológicos e patológicos da doença cervical. Nascia assim o relatório do Sistema Bethesda, que foi revisado em 1991, classificando as lesões escamosas intra-epiteliais cervicais em alto e baixo grau (THE 1991 BETHESDA WORKSHOP REPORT, 1992).

A triagem realizada pelo esfregaço citológico anormal, envolve diferenciação entre as lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau, lesões epiteliais escamosas de alto grau e o câncer invasivo.

Vários métodos de diagnóstico foram introduzidos na propedêutica do colo uterino, mas, para a demonstração direta da presença do HPV, somente três métodos foram consagrados. A microscopia eletrônica, na qual há visualização direta do vírus intra-celularmente, a imunohistoquímica que localiza o capsídeo protéico do vírus e a hibridização de ácidos nucléicos, os quais detectam os ácidos nucléicos virais. A hibridização molecular é o mais sensível método de detecção do HPV em espécies animais, em células ou tecidos, sendo o único capaz de identificá-lo e quantificá-lo. Sua finalidade precípua é de identificar os tipos e sub-tipos virais presentes na infecção (WRIGHT; SUN; KOULOS, 1995). É possível utilizá-lo em tecidos onde não existe expressão clínica da doença (fase latente) (SHERMAN et al., 1994).

O uso desses métodos permite verificar que o potencial de regressão, permanência e progressão das lesões intraepiteliais de baixo grau, depende

principalmente da sua associação com o tipo específico de HPV e da quantidade de vírus por célula. Tal fato levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1992 a reconhecer a infecção pelo vírus do HPV como o principal fator de risco para o câncer cervical.

ZÜR HAUSEN et al. (1974) e ZÜR HAUSEN (1976) foram os primeiros pesquisadores a publicarem trabalhos sobre hibridização molecular para detectar sequência de DNA virótico em tumores humanos. Um ano mais tarde, SOUTHERN (1975) descreve o método que transferia o DNA desnaturado do gel de eletroforese para o interior do filtro de nitrocelulose, método este que leva o seu nome. Desde então foram sucessivamente sendo descritas inúmeras técnicas de hibridização de ácidos nucléicos, sendo atualmente seis métodos principais comercialmente disponíveis: Hibridização Southern Blot, Hibridização de Dot Blot, Hibridização "in situ", Hibridização "in situ" com filtro, Hibridização sanduíche em meio fluido (solução de hibridização) e amplificação do DNA/RNA por PCR (reação em cadeia da polimerase).

Todos os testes de hibridização molecular baseiam-se no princípio de que, sob condições adequadas, uma fita de ácido nucléico (DNA/RNA) tem complemento específico.

Recentemente, passou-se a utilizar uma forma de solução de hibridização conhecida como ensaio de captura híbrida, que é um imunoensaio não radioativo que usa sondas de RNA para detectar DNA viral. Esse imunoensaio distingue por quimioluminiscência os tipos de HPV de baixo e alto risco e permite quantificá-los (LÖRINCZ, 1996a e b)

Foi proposto por ZÜR HAUSEN (1977) um efeito sinérgico entre o vírus HPV e outros fatores, para explicar o mecanismo carcinogênico do HPV.

A infecção cervical do HPV, detectada por técnicas de hibridização molecular é encontrada em 15 a 40% das mulheres sexualmente ativas (FRANCO, 1991; SCHNEIDER; KOUTSKY, 1992; SCHIFFMANN, 1994). A grande maioria é infecção transitória, e apenas uma pequena parte tende a abrigar persistentemente o mesmo tipo viral, desenvolvendo infecções crônicas do epitélio, levando ao carcinoma cervical (DE VILLIERS, 1989; HILDESHEIM et al., 1994; FRANCO et al., 1995; RICHART et al., 1998).

Os condilomas, (verrugas genitais), são adquiridos via atividade sexual, afetando principalmente adultos jovens sexualmente ativos. Os HPV de baixo risco oncogênico, particularmente os tipos 6 e 11, considerados os agentes causais do “condiloma acuminatum” vão prontamente infectar as camadas basais do epitélio via solução de continuidade. Mulheres com antecedente de condiloma tendem a apresentar história de múltiplos parceiros sexuais (SYRJÄNEN et al., 1984; DALING; SHEMAN; WEISS, 1986; BRISSON et al., 1987).

A imunossupressão em algumas mulheres, quer temporária como a desencadeada pela gestação que leva um recrudescimento das lesões condilomatosas (KOUTSKY; GALLOWAY; HOLMES, 1988) como em pacientes transplantadas, (HALPERT et al., 1986), e portadoras do vírus da imunodeficiência humana adquirida (AIDS) leva a um aumento da incidência de condilomas (SCHNEIDER, 1994; FERENCZY, 1995).

O uso de métodos anticoncepcionais também pode influenciar no desenvolvimento de lesões condilomatosas, como o uso de contraceptivo oral por longo período, que leva ao aumento do risco da ocorrência (FRANCESCHI et al., 1983; DALING; SHEMAN; WEISS, 1986; BRINTON et al., 1990; KJAER et al., 1993). Por outra parte, a maioria dos estudos não conseguiu mostrar uma associação entre a neoplasia cervical e a utilização de métodos contraceptivos orais (BRINTON, 1991). Estudos de BECKER et al. (1994) descrevem efeito protetor contra lesões de alto grau entre mulheres que haviam usado contraceptivos orais, (PARRAZINI et al., 1989; BECKER et al., 1994). Em contraste, NEGRINI et al. (1990) observaram risco aumentado estatisticamente significativo entre usuárias de contraceptivos orais por mais de 5 anos. Também há relatos de menor risco de neoplasia cervical entre as usuárias de contraceptivos de barreira, e uma relação inversa com o número de anos de uso (BRINTON, 1992; BECKER et al., 1994). Estudos epidemiológicos indicam consistentemente que o risco de uma paciente vir a desenvolver o cancer cervical é fortemente influenciado por dois fatores ligados à atividade sexual: o número de parceiros sexuais e a idade do primeiro coito, e pelo comportamento sexual do parceiro ou parceiros sexuais (BRINTON et al., 1987, 1989a e b; BRINTON, 1992). O risco aumenta proporcionalmente ao número de parceiros sexuais, tanto para lesões pré-invasivas como invasivas (PFISTER; WIELAND, 1999). Outros estudos epidemiológicos proporcionaram evidências do aumento do risco de mulheres fumantes desenvolverem lesões precursoras e invasivas do colo uterino (BRINTON, 1992).

A relação entre a paridade e o risco de desenvolvimento de carcinoma cervical é mostrada em dois estudos caso controle multicêntricos realizados nos Estados

Unidos (BRINTON et al., 1987), e países latino-americanos (BRINTON et al., 1989a e b). Ambos mostraram um aumento do risco com a paridade, sendo maior em mulheres latinas, pela sua maior taxa de fertilidade.

Embora o HPV seja essencial para a transformação pré-neoplásica ou neoplásica do colo uterino, há necessidade de co-fatores e eventos moleculares para que ocorra o desenvolvimento dessa transformação.

Até o presente, mais de 90 tipos de HPV foram descritos, sendo que aproximadamente 45 tipos infectam o trato urogenital masculino e feminino. As mais prevalentes viroses anogenitais podem ser divididas em três grupos: no primeiro grupo, chamado de baixo risco ou não oncogênico, estão incluídos os tipos 6, 11, 42, 43 e 44. As lesões anogenitais associadas com esses tipos de HPV são principalmente os condilomas acuminados (verrugas genitais) e as neoplasias intra-epiteliais de baixo grau (HPV, NIC I). O HPV de baixo risco é extremamente incomum em neoplasias intra-epiteliais de alto grau (NIC II, NIC III) e virtualmente nunca encontrado em carcinoma invasor. No segundo grupo de HPV anogenital estão incluídos os tipos 31, 33, 35, 51, 52. Considerado com risco oncogênico intermediário, o qual é raramente encontrado em condiloma, mas está associado com lesões de alto e baixo grau, sendo infreqüentes nos carcinomas invasores.

No terceiro grupo, considerado de alto risco estão os tipos 16, 18, 45, 56, encontrados substancialmente em lesões de alto grau e cânceres invasores (RICHART et al., 1998).

Não é incomum o epitélio ser infectado por mais de um tipo de HPV, principalmente nas lesões de baixo grau (LUNGU et al., 1992).

Não é possível, baseado somente nos achados citológicos ou histológicos das lesões de baixo grau, predizer qual o tipo de HPV envolvido na infecção, como também não é possível a distinção entre a neoplasia intra-epitelial de baixo grau e a simples infecção pelo HPV. Para que isto ocorra, há necessidade de utilizarmos outros recursos propedêuticos, entre os quais a hibridização de ácidos nucleicos para HPV e a colposcopia (CHAPMAN, 1995).

A captura híbrida como um método de hibridização molecular, nos permite identificar o tipo viral envolvido na amostra, assim como nos permite quantificá-los.

A colposcopia nos permite identificar, localizar e quantificar as lesões do trato genital inferior.

Tais correlações talvez possam ser utilizadas como parâmetros da evolução clínica, como fator preditivo e nos ajudar no manejo de mulheres que apresentem citologia oncológica alterada por lesão de baixo grau.

2 OBJETIVOS

- 1) Determinar a prevalência da positividade do tipo de HPV (não oncogênico, oncogênico e associação desses) pelo método de Captura Híbrida em micro-placa em lesões citológicas de baixo grau.
- 2) Avaliar a associação entre as variáveis epidemiológicas (idade, paridade, número de parceiros sexuais, fumo, anticoncepcionais e idade do primeiro coito) com os tipos virais.
- 3) Avaliar a quantidade viral através da média da carga viral (CV) dos tipos não oncogênico, oncogênico e associação desses.
- 4) Avaliar a relação entre o tipo viral e sua respectiva quantidade (CV), com a gravidade da lesão colposcópica através do IGCS (Índice de Gravidade Colposcópica Simplificado) criado para esse estudo.
- 5) Avaliar a influência da associação do vírus do tipo não oncogênico ao oncogênico, em relação à severidade das lesões colposcópicas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

HISTÓRICO

O HPV tem infectado a população mundial há muito tempo. Desde o tempo Greco-Romano as verrugas são conhecidas. Condyloma é derivado do grego e significa saliência ou protuberância e Myrmécia, que ainda é utilizada para identificação de algumas verrugas plantares. As verrugas genitais eram chamadas de Thymia que coloquialmente é conhecida por Ficus ou Figo.

A palavra Condyloma sobreviveu através dos tempos até os dias atuais, sendo que a palavra Condyloma Acuminatum só passou a ser utilizada no final do século XIX.

O termo Verruca ou Verruga é derivado do latim e significa saliência ou monte e foi introduzido pelo médico alemão Daniel Sennert.

O agente etiológico das verrugas era desconhecido até o século XX, tendo sido associado a várias teorias, como a transmissão por animais, provocada por trabalhos manuais, e a certas doenças como a sífilis e a gonococcia.

Em 1893 o dermatologista francês Gémy sugeriu que o Condyloma Acuminatum poderia ter a mesma origem das verrugas de pele, pela semelhança histológica. A partir daí, iniciaram-se anos de experiências sobre a contagiosidade das verrugas vulgares.

Em 1907, CIUFO, citado por ORIEL (1997), com a auto-inoculação de extrato filtrado de verrugas cutâneas, obteve a reprodução das verrugas.

Em 1949, STRAUSS et al. indubitavelmente demonstraram partículas virais em extrato de verrugas por microscopia de elétrons (ORIEL, 1997).

Apesar de conhecido desde a antigüidade, somente na década de 70 o HPV tornou-se um expressivo problema, particularmente pela íntima associação com lesões pré-malignas e malignas do trato genital inferior (ZÜR HAUSEN et al., 1974).

A caracterização cito-histológica da infecção cervical pelo HPV realizada por MEISELS; FORTIN (1976) e por PUROLA; SAVIA (1977), é considerada um marco no estudo das lesões pré-carcinomas e carcinomas do colo uterino. Desde então, pesquisas no campo da virologia molecular identificaram até o ano 2000, mais de 90 tipos e subtipos de HPV.

ESTRUTURA VIRAL

Os papilomas vírus humanos pertencem à família dos Papovavírus ou Papovaviridae. A família Papovavírus é constituída de dois gêneros, o gênero A, que compreende os Papilomas vírus , e o gênero B que compreende os Poliomas vírus e o SV-40 (vírus vacuolizante do macaco). Os Papilomas vírus apresentam como característica o fato de não serem cultiváveis e não produzirem infecções em outras espécies, sendo hospedeiro e tecido específico (MELNICK, 1962).

Apresentam um pequeno diâmetro (50 μm), e um genoma com 8.000 pares de bases nucleotídicas, com peso molecular de $5,2 \times 10^6$ daltons.

O capsídeo proteico viral é composto por 72 sub-unidades (capsômeros) organizadas em uma estrutura icosaédrica (PFISTER, 1987).

Um HPV é considerado um novo tipo, quando seu DNA tem menos de 50% de homologia com o genoma de um outro tipo já definido (HOWLEY, 1986).

A organização do genoma de todos os Papilomavírus parece ser semelhante. O genoma viral pode ser dividido em duas regiões codificantes separadas por uma não codificante. A região codificante E (early), que representa 45% do genoma viral, contém os gens E_1 e E_8 necessários para a replicação viral e transformação celular, e os genes E_5 , E_6 e E_7 responsáveis pelo potencial oncogênico.

Três produtos de genes da região codificante precoce do HPV, as proteínas E_5 , E_6 , E_7 (oncoproteínas), têm atividade oncogênica. Essas proteínas, interagindo com as proteínas celulares implicadas no controle da divisão celular, podem levar ao estímulo da proliferação celular ou interferir na diferenciação das células infectadas.

A região codificante L (late), representa 40% do genoma viral, contém os genes L_1 , L_2 que codificam as proteínas estruturais do capsídeo proteico.

A região não codificante representa 15% do genoma viral chamado de LCR (long control region), região de controle longo, e está envolvida no controle da expressão dos genes virais (SOUSA; DOSTATNI; YANIV, 1990).

HPV E PATOGENICIDADE

O envolvimento do HPV no desenvolvimento de neoplasias anogenitais foram descritas no final da década de 70 (ZUR HAUSEN, 1977; HOWLEY, 1991).

REID et al. (1987), observaram que o DNA do HPV que infecta o trato genital inferior, pode ser detectado na maioria das lesões, independentemente do local e do grau de patogenicidade, postulando que variações individuais na distribuição da doença, são explicadas pela predileção de um local anatômico específico apresentado por certos tipos virais e pela resposta do hospedeiro.

WICKENDEN et al. (1987), ao avaliarem a prevalência do DNA do HPV entre 215 mulheres com citologias normais e 74 com neoplasias intra-epiteliais cervical, através da utilização de hibridização Dot Blot com sondas 6 e 11, 16 e 18, observaram que 10 % das mulheres com citologias oncológicas normais eram portadoras do HPV do tipo 16. O acompanhamento de 27 mulheres HPV positivas com citologias normais por um período de 3 anos, mostrou que elas não desenvolveram neoplasias intra-epiteliais, evidenciando que outros fatores além da presença viral possam estar envolvidos na gênese do processo neoplásico.

O HPV 16 é mais prevalente em lesões queratinizadas e bem diferenciadas (WILCZYNSKI et al., 1988; LÖRINCZ et al., 1992).

O HPV 18 é mais prevalente nos adenocarcinomas (KING et al., 1989), e pouco diferenciado (BARNES et al., 1988).

WALKER et al. (1989), observaram que os adenocarcinomas indiferenciados tinham um pior prognóstico quando comparados com os carcinomas escamosos. Tais resultados foram confirmados por BURNETT et al. (1992).

DE VILLIERS et al. (1992) observaram que mais de 20 tipos virais foram identificados em lesões pré-malignas e malignas do trato genital inferior.

Os carcinomas HPV negativos estavam associados a um pior prognóstico e a uma elevada taxa de mortalidade RIOU et al. (1990).

Os trabalhos de SYRJÄNEN (1990), assim como KOUTSKY et al. (1992) e EBISAWA et al. (1994), mostraram uma rápida progressão da infecção do HPV para NIC de alto grau, principalmente quando estas lesões eram causadas por HPV 16 e 18. Ambos chegaram às mesmas conclusões, embora no trabalho de SYRJÄNEN essa progressão levasse mais tempo para ocorrer. Dessa forma concluem que o tipo de HPV encontrado na cervix uterina, parece predizer o risco de progressão da lesão para NIC de alto grau.

Essa associação fora confirmada em estudo prospectivo anterior realizado por CAMPION et al. (1986).

ZUR HAUSEN (1991) observou que, em mais de 90% dos carcinomas escamosos cervicais, foi identificada a presença do HPV, sendo os tipos 16 e 18 os mais prevalentes, tendo sido encontrados em mais de 80% dos carcinomas cervicais. O HPV 16 tem uma maior prevalência mundial apresentando certas variações geográficas.

A prevalência do DNA do HPV em uma população, depende fortemente da idade e da prática e do comportamento sexual. Mulheres jovens sexualmente ativas, tem uma

alta prevalência de DNA de HPV (FISHER; ROSENFELD; BURK, 1991; LEY et al., 1991).

Atualmente está claro que a transmissão do HPV se faz de pessoa a pessoa e que é sexualmente transmissível (FISHER; ROSENFELD; BURK, 1991) sendo, portanto, incomum o achado do HPV em cervix de mulheres virgens (FAIRLEY et al., 1992).

Embora a prevalência do HPV cervical possa ser fortemente influenciada pela idade e pelo comportamento sexual, estima-se uma taxa de:

1 a 3 % de diagnósticos de lesões de baixo grau, quando da utilização da citologia como método propedêutico;

5 a 10 % quando usado método de hibridização não amplificado de DNA;

15 a 30 % quando usados métodos amplificados como o PCR.

Portanto, a prevalência do DNA do HPV poderá variar de 1% até próximo de 100%, dependendo da sensibilidade do método utilizado na pesquisa e do perfil de risco do grupo estudado (GUERRERO et al., 1992).

Segundo SCHIFFMAN (1992a), a prevalência do HPV declina com a idade, tendo seu pico entre 16 e 25 anos. A alta prevalência do HPV em mulheres jovens sexualmente ativas é consistente com a curva epidemiológica, na qual há um rápido aumento da prevalência, após exposição ao primeiro coito.

BRINTON (1992), através de estudos epidemiológicos, nos fornece evidências para sugerir que o risco de desenvolvimento do câncer cervical possa ser sexualmente transmissível.

HERRINGTON (1994) evidencia ser o HPV o agente infeccioso mais fortemente associado com o câncer cervical.

Embora a maioria das infecções de HPV tendam a desaparecer em meses ou em poucos anos após o diagnóstico (HILDESHEIM et al., 1994; DE VILLIERS et al., 1997), um percentual delas evolui para lesões intra-epiteliais cervicais, onde a prevalência do DNA do HPV em casos confirmados de neoplasias intra-epiteliais cervicais, aproxima-se de 100%, sendo que, as de alto risco, são responsáveis por mais de 50% desse achado (WAGNER et al., 1987; SHERMAN et al., 1994; WIELAND; PFISTER, 1996; WOODMAN et al., 1996).

BOSCH et al. (1995), em revisão de 1000 espécimes de cânceres cervicais de 22 países, confirmam conclusivamente que o HPV é o principal fator etiológico do câncer cervical no mundo e que mais de vinte tipos diferentes podem comprometer a região anogenital.

Em 1995, a INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER publica a identificação do HPV em mais de 95% dos carcinomas cervicais, principalmente os tipos 16 e 18.

HERRERO et. al. (2000), em estudo sobre HPV e neoplasias cervicais em área rural da Costa Rica, observaram que entre mulheres com citologias normais, o HPV teve um pico de prevalência ao redor dos 25 anos e, outro, a partir dos 55 anos, sendo associado a vírus do tipo não oncogênico. Entre as que apresentaram lesões de baixo grau, a prevalência da infecção viral decrescia com a idade. As lesões de alto grau apresentaram um pico da prevalência ao redor dos 30 anos e, outro, após os 65 anos. Entre as mulheres que apresentaram lesões de baixo grau, 73% eram positivas para

vírus do tipo oncogênico e 89% nas lesões de alto grau. Confirmam, portanto, o decréscimo da prevalência do HPV com a idade, e o envolvimento do HPV do tipo oncogênico envolvido na gênese do câncer cervical.

HPV: TIPOS VIRAIS E PROGRESSÃO À NEOPLASIA

LÖRINCZ et al. (1992) realizaram estudo multicêntrico envolvendo 2637 mulheres que apresentavam alterações citológicas utilizando biópsia de lesões escamosas de baixo grau, alto grau e cânceres cervicais invasores onde a identificação da presença do HPV foi realizada através da hibridização Southern Blot. Observaram que em 30% da amostra, não foi identificada a presença do DNA de HPV, em 17% foi observada a presença do DNA de HPV 6,11, 42, 43, 44, em 20% foi identificada a presença de vírus 31, 33, 35, e, em 23%, outros tipos virais. Em decorrência da forte associação de certos tipos virais a específico tipo de lesões, classificaram os tipos virais como se segue:

HPV de baixo risco: (6, 11, 42, 43, 44), presentes em 20,2% das lesões de baixo grau, mas ausentes em cânceres invasores.

HPV de risco intermediário: (31, 33, 35, 51, 52, 58), detectado em 23,8% das lesões de alto grau, mas somente 10,5% dos cânceres invasores.

HPV de alto risco: (16, 18, 45, 56), sendo o HPV 16 associado em 47,1% a lesões de alto grau, e o HPV 18 encontrado em 26,8% dos carcinomas invasores, mas apenas 6,5% associado a lesões de alto grau.

RICHART; BARRON (1969), acharam uma taxa de progressão de 20,3% de displasia leve para displasia severa de 1 a 3 anos.

Embora lesões de baixo grau, na maioria das vezes, tendam regredir à citologia normal. Tais lesões podem progredir para lesões de alto grau, com um risco de aproximadamente 15 a 25%, em 2 a 4 anos.

As taxas estimadas de progressão de lesões escamosas de baixo para alto grau são algumas vezes conflitantes, devido a diferentes terminologias diagnósticas e diversos métodos de estudo, conforme se segue análise de vários autores:

- HALL; WALTON (1968) relataram a evolução de displasias leves a acentuadas em 11,6%.

- RICHART; BARRON (1969), relataram a progressão das displasias moderadas para lesões mais severas em 90% dos casos, em 10 anos sem tratamento.

- SEDLIS; COHEN; SALL (1970), encontraram uma progressão de 42%, persistência em 35% e progressão em 18%.

- NASIEL; NASIEL; VACLAVINKOVA (1983), ao avaliarem displasias moderadas, durante um período de 5 anos, observaram uma regressão em 54% das lesões, persistência em 16% e progressão em 30%.

- NASIELL; ROGER; NASIELL (1986), observaram que 16% de 555 mulheres estudadas com NIC I progrediram para o NIC III ou carcinoma invasor, num período de quatro anos.

- FLANNELLY et al. (1994), em um estudo de 538 mulheres com discariose leve, que evoluíram para NIC III, obtiveram uma taxa de progressão de 35% em um a dois anos.

- MATSUURA et al. (1998), observaram a regressão das lesões de baixo grau em 49%, persistência e progressão em 51% após 5 anos de acompanhamento.

Os pesquisadores concluem que a taxa de progressão de uma lesão de baixo grau poderá ser influenciada pelo método de seguimento, com ou sem biópsia, assim como o período de observação (GAARENSTROOM et al., 1994).

SCHWARZ et al. (1985), CHOO; PAN; HAN (1987), observaram que a progressão da lesão dependia da integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, resultando em disruptura do gen E2, que leva à perda do efeito repressor sobre os genes E6 e E7. A superprodução de proteínas E6 e E7, segundo VOUSDEN; WREDE; CROOK (1991), transformam as células, conferindo-lhes a imortalidade (MATLASHEWSKI et al., 1988).

Há um aumento progressivo das evidências de que o estado físico do HPV dentro do núcleo da célula hospedeira, possa ser o maior fator preditivo de progressão para neoplasias de alto grau, refletindo a progressão em direção à malignidade (LEHN et al., 1998).

As assim chamadas oncoproteínas virais, são encontradas “in vitro” ligadas às proteínas das células hospedeiras Rb e P53, que são genes inibidores de tumores (DYSON et al., 1989 e WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990). Os genes supressores de tumores (P53 e Rb), são os responsáveis pela regulação da divisão celular em uma célula normal. Demonstra-se “in vitro” que estes genes acham-se ligados às oncoproteínas virais E6 e E7, o que leva a célula hospedeira à perda da sua regulação de crescimento. As oncoproteínas E6 e E7 do HPV tipo 16 e 18 ligam-se às proteínas inibidoras de tumores P53 e Rb respectivamente, mais fortemente do que as

oncoproteínas do tipo 6 e 11 (VOUSDEN; WREDE; CROOK, 1991; FUCHS; PFISTER, 1996).

Segundo COOPER et al. (1991), o HPV na forma episomal ou não integrada, é encontrado nas formas iniciais das neoplasias intra-epiteliais, e a forma integrada ao genoma da célula hospedeira é detectada mais freqüentemente em lesões HPV positivas, neoplasias intra-epiteliais de alto grau e carcinoma de células escamosas. As lesões tardias poderão ou não ter evidências do DNA do vírus HPV na forma episomal. As lesões intra-epiteliais de alto grau podem originar-se de um simples clone celular onde se deu a integração viral (SHIROSAWA et al., 1986; BERUMEN et al., 1995; LEHN et al., 1998). Estas observações são fortemente sustentadas por evidências experimentais "in vitro", onde há relação entre a interação das oncoproteínas transformantes virais e o gen supressor de tumores da célula hospedeira, em nível molecular (VOUSDEN; WREDE; CROOK, 1991).

Em decorrência da perda do controle do crescimento celular, haverá um descontrole do ciclo celular, levando à formação de clones celulares anormais, promovendo o possível mecanismo pelo qual o HPV promove o seu efeito oncogênico (DYSON et al., 1989; HELLBERG et al., 1993).

Como relatado por BEDELL et al. (1991), o processo de replicação viral depende do grau de diferenciação do epitélio envolvido. Uma baixa carga viral relatada em adenocarcinomas, provavelmente seja devido ao fato de que a infecção e a replicação viral ocorram em células de reserva do epitélio colunar endocervical, onde este processo não se dá da mesma forma que no epitélio escamoso. Normalmente o esfregaço contém comparativamente um menor número de células endocervicais. Essa

hipótese foi confirmada por CHUA; HJERPE (1996), que encontraram uma positividade do HPV em esfregaços de pacientes com carcinomas cervicais escamosos em 70% e 50%, em esfregaços de pacientes com adenocarcinomas.

A integração do DNA HPV no genoma das células hospedeiras aumentando a expressão das proteínas E6 e E7 e a ruptura dos genes E1 e E2 leva ao aumento da replicação viral intracelular. Esse aumento da expressão das oncoproteínas poderá ser mais importante do que a replicação viral (níveis de carga viral), para o estabelecimento de lesões de alto grau e progressões neoplásicas (THIERRY, 1996).

Infecção persistente por tipo específico de HPV, particularmente em mulheres com altas cargas virais, parece estar associada à persistência e progressão para lesões escamosas de alto grau (HO et al., 1995).

Contínuas altas cargas virais podem ser preditivas da persistência ou progressão das anormalidades epiteliais cervicais e a captura híbrida pode ser utilizada para quantificar o DNA do HPV presente na amostra (LÖRINCZ, 1996b).

WALBOOMERS et al. (1995), na Holanda, utilizando arquivo de citologias falso negativas, verificou a persistência do HPV do tipo 16 e 18 na maioria dos esfregaços além de seis anos, antes do diagnóstico da neoplasia ser realizado. Esse estudo demonstrou que a persistência da infecção do HPV de alto risco está fortemente associada a neoplasias intra-epiteliais cervicais e ao aumento do risco de subsequente progressão para o câncer cervical. Dessa forma sugere a inclusão de testes de hibridização de ácidos nucléicos como auxiliar de diagnóstico, reduzindo a possibilidade de ocorrência de citologias falso negativas.

Na Suécia, CHUA; HJERPE (1996), em exames de arquivo de citologias oncológicas colhidos previamente ao diagnóstico de carcinoma cervical, o DNA do HPV foi detectado na maioria dos esfregaços. A persistência da infecção do HPV foi demonstrada por um período além de sete anos, que precedia o diagnóstico do câncer cervical.

Segundo MUÑOZ; BOSCH (1997), existe uma relação chamada dose resposta com o nível de carga viral. Altos níveis de carga viral de HPV, podem aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias cervicais mais do que baixos níveis.

A ação viral crônica sobre o epitélio cervical pode permitir o acúmulo de danos cromossômiais na célula hospedeira conduzindo as lesões de baixo grau para alto grau (HO et al., 1995; ROMEY et al., 1997).

A infecção por múltiplos tipos virais oncogênicos com alta carga parece não aumentar o risco de desenvolvimento de lesões de alto grau (HO et al., 1998).

HERRINGTON (1995), ao estudar a relação entre o HPV e as neoplasias cervicais e outros fatores conclui, o que hoje é plenamente aceito, que a infecção do HPV por si só não é responsável pelas neoplasias cervicais, mas há vários co-fatores associados que podem alterar a evolução da doença. Embora muitos co-fatores possam estar envolvidos na oncogênese do colo uterino, nenhum deles por si só mostrou-se capaz de ser preditivo do risco de progressão para neoplasias de alto grau.

Existem três tipos de fatores postulados que influenciam o risco de progressão para lesão escamosa de alto grau, sendo esses os mesmos que foram estabelecidos para o câncer cervical. Fatores virais, do hospedeiro e envolvimento de co-fatores:

Fatores Virais

Entre mulheres com lesões escamosas de baixo grau, o HPV de alto risco tem um valor preditivo de maior risco de progressão do que tipos virais de baixo risco ou lesões negativas para HPV (CAMPION et al., 1986).

Além do tipo viral, a carga viral do DNA do HPV está relacionada com lesões escamosas de alto grau (CUZICK et al., 1992).

O tempo de evolução da infecção do HPV é outro fator ligado ao vírus que pode alterar a evolução da doença, pois os graus de atipia nuclear induzidos pelo HPV na célula hospedeira, podem aumentar com o tempo da duração da infecção (ZÜR HAUSEN, 1994).

NOBBENHUIS et. al. (1999), em estudo prospectivo sobre o “status” do HPV em relação à persistência e progressão das neoplasias intra-epiteliais cervicais em 353 mulheres que apresentavam laudos citológicos com discariose leve, moderada e acentuada concluem que a persistência da infecção viral por vírus do tipo oncogênico é o requisito para o desenvolvimento e manutenção de lesões de alto grau. Não foi observada a progressão de lesões na ausência de HPV do tipo oncogênico.

Fatores Do Hospedeiro

Um dos fatores ligados ao hospedeiro, relacionado com a progressão de lesões de baixo para alto grau, é provavelmente o fator imunológico. Outro fator é a paridade, que pode atuar influenciando a imunidade ou fatores nutricionais, hormonais ou

traumático-mecânicos (MUÑOZ et al., 1993). Embora para NASIELL; ROGER; NASIELL (1986), a idade não tenha se mostrado como um forte fator preditivo de progressão de lesões de baixo para alto grau, desde que a severidade da lesão inicial tenha sido levada em consideração.

Co-Fatores

Há evidências epidemiológicas sugerindo que a neoplasia cervical comporta-se como uma doença transmissível. Sustentando esta hipótese, várias medidas relacionadas ao comportamento sexual estão associadas ao aumento do risco para neoplasia cervical.

REEVES et al. (1987) em estudo caso controle sobre papiloma vírus e câncer cervical na América Latina (Panamá, Costa Rica e Colômbia) de julho a setembro de 1985, observaram que a idade do primeiro coito era um fator de maior risco para o desenvolvimento de lesões carcinomatosas. Este fator foi encontrado em 53% dos casos contra 34% dos casos controle (OR: 2,36, IC : 1.96 – 5,80).

Esses resultados também foram observados por BOSCH et al (1992) e MUÑOZ et al. (1993) que encontraram uma associação entre a idade do primeiro coito com o desenvolvimento NIC III e câncer invasor, entre mulheres espanholas e colombianas.

MUÑOZ; BOSCH (1989) ao analisar a epidemiologia do carcinoma cervical observaram um maior risco em mulheres com múltiplos parceiros sexuais, promiscuidade sexual do parceiro e início precoce da atividade sexual.

REEVES et al. (1989) em um estudo caso controle multicêntrico realizado de novembro de 1986 a junho de 1987 na América Latina, (Panamá, México, Costa Rica e Colômbia) estudaram 759 casos de cânceres invasores e 1467 controles. Observaram ser os tipos de HPV 16 e 18 os mais freqüentemente encontrados associados com o câncer cervical. O número de parceiros sexuais apresentou um risco de 1,6 (IC: 95%, 1,1 – 2,7) quando comparava um parceiro sexual com quatro ou mais. A idade do primeiro coito apresentava um risco relativo de 2,1 (IC : 95% - 1,5 – 2,8) quando comparava abaixo de 16 anos com 20 ou mais. O uso de anticoncepcional oral e fumo não mostraram relação com o fator de risco para o câncer cervical.

SCHIFFMAN; BAUER; HOOVER (1993) observaram que mulheres HPV negativas, cujo primeiro coito se deu abaixo dos 17 anos, apresentavam um risco de 2,4 vezes maior de desenvolverem neoplasias intra-epiteliais cervicais do que aquelas cujo primeiro coito se deu após os 21 anos; contudo não observaram nenhuma relação entre mulheres HPV positivas.

KJAER et al. (1998) ao conduzirem um estudo caso controle, em que avaliavam diferentes fatores de risco em lesões epiteliais de baixo e alto grau entre mulheres HPV positivas e negativas, observaram ser a presença do HPV, o maior fator de risco para o desenvolvimento de lesões escamosas tanto de baixo, como de alto grau. O fator de risco das lesões de baixo grau era significativamente diferente entre as lesões de baixo e alto grau e que, entre as mulheres HPV positivas, as lesões de alto grau estavam relacionadas com a idade do primeiro coito; tempo de atividade sexual sem uso de anticoncepcionais orais (RR : 3,3; IC 95% - 1,2 – 9,3). O risco achava-se aumentado

entre as mulheres fumantes comparadas com as não fumantes, tanto nas lesões de baixo como de alto grau.

Para JONES et al. (1990) e PARAZZINI et al. (1992), o número de parceiros sexuais foi considerado como um fator de risco, tanto para as lesões pré-invasivas como invasivas do colo do útero.

Em relação à paridade BOSCH et al. (1992) e BECKER et al. (1994), não encontraram relação com lesões invasivas e pré-invasivas respectivamente.

SCHIFFMAN; BAUER; HOOVER (1993) notaram um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias intra-epiteliais cervicais com o aumento da paridade que persistiu mesmo após o controle das variantes idade e status do HPV.

MUÑOZ et al. (1993), verificaram um aumento de 2 vezes o risco de desenvolvimento de neoplasias de alto grau com a paridade no estudo entre mulheres colombianas, após a correção dos possíveis fatores de confusão.

No Brasil, ELUF NETO et al. (1994) observaram um aumento do risco de desenvolvimento de lesões de alto grau e carcinomas invasores em 5 vezes com a paridade, após o controle dos fatores confundidores.

Vários estudos epidemiológicos relacionam o fumo como fator de risco de desenvolvimento e progressão de lesões cervicais:

BARTON et al. (1989) observaram que o achado de um reduzido número de células de Langerhans no epitélio cervical de fumantes, sugere que esta redução favoreça a persistência do antígeno viral no epitélio cervical.

O aumento da prevalência do HPV em fumantes, tem relação com o número de cigarros, os quais contêm hidrocarbonetos policíclicos, que podem levar a mutações

gênicas. Esses agentes carcinogênicos presentes no tabaco podem agir sozinhos ou sinergicamente com o HPV (SIMONS; PHILLIPS; COLEMAN, 1993).

MUÑOZ et al. (1993), ao estudarem diversos fatores de risco para o desenvolvimento de NIC III e carcinoma "in situ" entre mulheres espanholas e colombianas, observaram um aumento do risco entre mulheres fumantes colombianas OR = 2,0 (IC :95%, 1,3 – 3,0), e não entre mulheres espanholas OR = 1,3 (IC: 95%, 0,7 – 2,3).

Mulheres fumantes com anormalidades cervicais leves são candidatas a apresentarem lesões de maior gravidade, pois esses agentes carcinogênicos contidos no tabaco poderão agir como co-fatores que, atuando sinérgicamente com o HPV, podem estar envolvidos na carcinogênese cervical (LUESLEY et al., 1994).

CERQUEIRA et. al. (1998), ao estudarem o efeito do fumo sobre a cérvix de mulheres brasileiras de Salvador (Bahia) e São Paulo (SP), notaram um aumento do efeito mutagênico nas células cervicais entre fumantes. A progressão das lesões escamosas estavam associadas com o aumento da freqüência do dano cromossômico. Concluem, portanto, que o hábito de fumar induz a um risco adicional à progressão das lesões de baixo grau.

HO et al. (1998) ao estudarem o HPV 16 e o fumo como fator de risco para o desenvolvimento de lesões de alto grau observaram, após o controle de fatores como a idade, nível cultural, etnia, freqüência de coleta de citologia oncológica, que o risco aumentava para o NIC III, mas não para o NIC II com o número de cigarros utilizados por dia (OR= 1,49 para até 10 cigarros e 3,35 para mais de 10). Concluem existir uma

relação entre vírus do tipo oncogênico, principalmente o tipo 16 e lesões de alto grau, sendo o cigarro um fator adicional de risco para a progressão neoplásica.

No que diz respeito à utilização de métodos anticoncepcionais e a sua correlação com lesões pré-carcinomas e carcinomas, vários estudos epidemiológicos foram realizados principalmente a partir da década de 70, os quais veremos:

- BIBBO; KEEBLER; WIED (1971) e MILLER (1973), ao estudarem mulheres com citologias normais e alteradas, não acharam diferenças entre os grupos de usuárias e não usuárias de anticoncepcional oral.

- WORTH; BOYES (1972), em estudo caso controle em que comparavam o uso de anticoncepcional oral entre 310 mulheres de 20 a 29 anos, com citologia de carcinoma "in situ", e 682 mulheres controle, com citologias negativas não acharam diferença entre os grupos.

- THOMAS (1972) em um grupo de 324 mulheres com citologias de displasias e carcinoma "in situ", e um grupo controle de 302 mulheres da mesma comunidade, também não achou diferença entre os grupos de usuárias e não usuárias de anticoncepcionais orais hormonais.

- BOYCE et al. (1977) em estudo caso controle de 689 pacientes com carcinoma cervical e 1.300 controles com citologias normais, não observaram diferença entre os grupos, nem quanto ao tempo de uso, nem qual o tipo de estrogênio usado no anticoncepcional ou início da utilização desse anticoncepcional.

- KELSEY; HILDRETH (1983), em revisão da associação entre o uso de anticoncepcionais orais e neoplasia cervical, concluíram que a correlação permanece incerta.

- VESSEY et al. (1983), sugerem que o longo tempo de uso de anticoncepcionais orais hormonais poderá aumentar o risco de neoplasia cervical.

- CLARKE et al (1985), em estudo caso controle de 250 mulheres com citologias de displasias cervicais e 500 casos controle, acharam um aumento do risco com o tempo de uso de anticoncepcionais orais hormonais, porém houve uma diminuição desse risco quando ajustados os fatores confundidores para comportamento sexual e fumo.

- BRINTON et al. (1986), ao avaliarem a relação entre o uso de contraceptivo e risco de carcinoma cervical invasor, através de estudo caso controle de 479 pacientes e 789 controles em cinco regiões dos Estados Unidos, após controlados os fatores confundidores ligados ao comportamento sexual e sócio demográfico, concluíram haver um risco relativo de 1,5 após mais de cinco anos de uso de contraceptivo oral. O risco estava aumentado tanto para carcinoma escamoso como para adenocarcinoma. Esse risco achava-se aumentado entre usuárias de pílulas de alta dosagem estrogênica.

- CELENTANO et al. (1987), também em estudo caso controle sobre contraceptivos e câncer cervical observaram que, em todos os tipos de contraceptivos utilizados, o tempo de uso era um fator protetor para o câncer cervical OR = 0,38 (IC 95%, 0,2 – 0,7). O uso de contraceptivo oral apresentou OR = 0,48, diafragmas OR= 0,29 e espermaticidas vaginais OR= 0,28. Após controle de fatores confundidores como idade do primeiro coito e fumo, somente a utilização de gel espermaticida

permaneceu com relação estatisticamente significativa. Concluem que, o uso de contraceptivos orais e de barreira não são protetores para o câncer cervical, e que a eficácia dos espermaticidas vaginais em prevenir tais patologias parece estar relacionada com a sua ação antiviral.

- NEGRINI et al.(1990) observou que o longo tempo de uso de anticoncepcionais orais (≥ 5 anos), estavam relacionados com o aumento do risco de lesões de alto grau, mas não com lesões cervicais de baixo grau. Esses resultados também foram observados por LEVINE et al. (1993) e BRISSON et al. (1994), porém o tempo de uso foi de 4 ou mais e 6 ou mais anos, respectivamente.

O aumento do risco de desenvolvimento de lesões de alto grau está associado com o tempo de atividade sexual sem a utilização de métodos contraceptivos de barreira. Mulheres que nunca utilizaram métodos de barreira apresentaram o aumento de risco em até 4 vezes. Isto pode ser explicado, pois mulheres que nunca utilizaram métodos físicos apresentam a cérvix uterina exposta a repetidas e ou persistente infecções pelo vírus HPV, e conseqüente aumento do risco de desenvolvimento de lesões de alto grau (KJAER et al., 1998).

KJAER et al. (1998) em estudo caso controle, que faz parte de um grande estudo de cohort ora em desenvolvimento na Dinamarca, concluem haver relação positiva com o aumento do risco e com o aumento do número de parceiros sexuais, tempo de atividade sexual sem uso de contraceptivos de barreira, idade precoce do primeiro episódio de verrugas genitais, tempo de uso de anticoncepcionais orais e o fumo em lesões de baixo e alto grau.

MÉTODOS DE HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DO HPV

A partir de 1979, foram classificados mais de 90 tipos de HPV baseados na semelhança estrutural do DNA do HPV das regiões E6, E7, e L1 do genoma viral. Quando esta homologia é menor que 50% do total de tipos de HPV anteriormente descritos, é considerada um novo tipo (COGGIN; ZÜR HAUSEN, 1979).

Na última década, os testes para detectar a presença do DNA do HPV têm sido a chave para informações epidemiológicas e patológicas. Além de ser uma valiosa ferramenta de pesquisa, esses métodos poderão ser um grande recurso propedêutico na investigação de citologias de baixo grau (COX et al., 1995; WRIGHT; SUN; KOULOS, 1995).

Os métodos mais freqüentemente utilizados, comercialmente disponíveis, são explicados na sequência:

Southern Blot

Este teste leva o nome do cientista que primeiro introduziu esta técnica, revolucionando a biologia molecular. Os testes Southern Blot são um dos mais confiáveis, ainda que pese o tempo de sua realização. Baseia-se na detecção da presença de fragmentos específicos de DNA em uma amostra, onde o DNA é isolado das células e digerido por enzimas de restrição. O DNA é submetido a eletroforese de gel de agarose, sendo desnaturado, adquirindo a capacidade de ligação com sondas

de ácidos nucléicos. Transferidos para filtros de nitrocelulose, são hibridizados com sondas de DNA de HPV específicos. Após lavagem para remover as sondas não ligadas, o filtro é examinado usualmente por radiografia. A presença de sondas ligadas indica que a amostra testada contém DNA de HPV. Com a utilização de vários tipos de sondas específicas, teremos os tipos de HPV presentes na amostra (REID; LÖRINCZ, 1995).

LÖRINCZ et al. (1992) utilizaram a técnica de Southern Blot para avaliar o risco relativo associado aos quinze tipos de HPV mais comuns na região anogenital. Ao analisarem 2.627 mulheres (153 cânceres, 261 lesões de alto grau, 377 lesões de baixo grau, 270 atipias limítrofes e 1.566 controles) em estudo caso controle observaram: o DNA do HPV foi detectado em 79,3% dos casos e 6,4% dos controles. O HPV de baixo risco estava presente em 20,2% das lesões de baixo grau porém, ausentes nos cânceres invasores. Os de risco intermediário foram encontrados em 23,8% das lesões de alto grau e somente 10,5% em cânceres invasores. Os de alto risco em 47,1% das lesões de alto grau e cânceres invasores.

IKENBERG et al. (1994) ao avaliarem a correlação do DNA do HPV do carcinoma cervical com dados clínicos e epidemiológicos, e sua influência no prognóstico, utilizaram a técnica de Southern Blot. Ao analisarem 205 carcinomas invasores primários, obtiveram os seguintes resultados: o DNA do HPV foi detectado em 73% dos casos, sendo o tipo 16 o mais freqüentemente encontrado (83%). O número de cópias de vírus por célula do HPV 16 foi maior em tumores queratinizantes do que dos não queratinizantes.

Dot Blot

Os ensaios de Dot Blot utilizam muitos dos princípios empregados na técnica de Southern Blot, porém são mais fáceis de ser realizados.

No Dot Blot, o DNA do HPV é extraído das células, desnaturado e diretamente aplicado sobre filtro de nitrocelulose, sem passar pelo tempo de digestão das enzimas de restrição ou pela eletroforese.

Assim como no Southern Blot, o filtro de nitrocelulose é hibridizado com sondas, lavado para a extração das sondas não ligadas e examinado através de autoradiografia. É um método rápido e pode ser usado para seleção de um grande número de amostras; entretanto, a presença de um grande número de DNA celular presente no Dot Blot poderá gerar dificuldades na distinção entre um sinal fraco e um sinal falso positivo (REID; LÖRINCZ, 1995).

VIRTEJ et al. (1998) na Romênia, ao estudarem a presença de fragmentos de DNA de HPV 16 / 18 por Dot Blot após amplificação por PCR de 28 pacientes que apresentavam neoplasia epitelial cervical observaram uma positividade do HPV 16 em 64,3% e o HPV 18 em 39,6%, entretanto 21% das pacientes apresentaram ambos os tipos de HPV.

MATSUURA et al. (1998) no Japão, ao acompanharem por mais de cinco anos lesões de baixo grau em 43 pacientes com citologia, colposcopia e Dot Blot observaram uma regressão da doença em 50%, persistência e progressão em 50%. Sendo o DNA do HPV negativo em 81% das lesões que regrediram e 55% das que persistiram ou progrediram.

Hibridização “In Situ”

A técnica de hibridização “in situ” geralmente é utilizada em cortes histológicos ou esfregaços celulares, promovendo não apenas a localização exata da seqüência do HPV alvo, como também detalhes morfológicos do conteúdo tissular ou celular.

As células ou tecidos são tratadas com substâncias detergentes ou enzimáticas como a protease ou ambas; que irão promover um aumento da permeabilidade celular, de modo que pequenos poros permitam ou facilitem o acesso dos exploradores ao núcleo. O material congelado ou fixado é colocado sobre lâminas. A aderência do material é conseguida através do revestimento da lâmina com poli D – lisina, poli L – lisina, gelatina ou organosilano.

A morfologia tecidual ou celular é mantida.

O DNA celular é desnaturado com a utilização de calor ou álcali. A hibridização ocorre dentro do núcleo das células permeabilizadas. Ácidos nucléicos marcados quimicamente ou por isótopos são utilizados como sondas e, após a hibridização, a amostra é lavada.

Os sinais positivos são visualizados por autoradiografia ou por métodos de detecção enzimática. As sondas de RNA assimétricas são geralmente mais utilizadas devido a sua alta sensibilidade e não permitir o reanelamento. Se sondas biotiniladas forem utilizadas, reações químicas como peroxidase – antiperoxidase ou complexo de estreptavidina são utilizadas.

Geralmente as sondas marcadas com isótopos apresentam maior sensibilidade do que as quimicamente marcadas, entretanto as últimas têm uma grande vantagem sobre as anteriores, pois podem ser mantidas por um longo período de tempo e não causam danos radiativos ao processador.

É um método que detecta somente locais onde haja expressão da infecção viral.

As infecções latentes não contêm ácidos nucléicos suficientes para gerar um sinal positivo no ensaio, assim como não fornece o tipo viral envolvido. É um método menos sensível que o Southern Blot e Dot Blot, detectando somente infecções virais que apresentem 10 a 20 ou mais cópias de vírus por célula (REID; LÖRINCZ, 1995).

BAR-AM et al. (1995) ao avaliarem a prevalência da infecção pelo Papiloma Vírus Humano e a presença do DNA do HPV, em parceiros sexuais masculinos de mulheres judias, que apresentavam lesões pré-malignas do trato genital inferior, usando hibridização "in situ" observaram uma prevalência de 86,8% em 213 biópsias realizadas. Das 57 mulheres e seus parceiros sexuais que foram examinados pela colposcopia/peniscopia e biópsia, o exame histológico revelou somente 48 casos positivos. Foi utilizada a hibridização "in situ" para HPV 6/11 e 16/18. Os casos masculinos tiveram 58,3% de positividade. Em 41,6% dos casos femininos a hibridização "in situ" não conseguiu demonstrar a presença do HPV. Este estudo nos mostra a baixa sensibilidade desse método.

HERRINGTON et al. (1996), ao avaliarem a utilização de testes de hibridização, comparando a hibridização "in situ" com PCR, em mulheres com lesão de baixo grau citológico observaram das 167 mulheres examinadas, foram identificados 46 casos com lesões de alto grau após um segmento de 27 meses. Ambos os métodos

mostraram a associação do HPV com lesões de alto grau e com idade acima de 30 anos. A hibridização “in situ” mostrou ser mais preditiva, porém menos sensível do que o PCR em mulheres acima de 30 anos.

Hibridização “In Situ” Com Filtro (Fish)

A hibridização “in situ” com filtro combina procedimentos da hibridização in situ e os Dot Blot. É um rastreamento simples que omite a fase de extração do DNA celular. As células são colocadas em suspensão em uma solução salina de tampão fosfato e, posteriormente, colocadas sobre o filtro de nitrocelulose. O DNA é desnaturado pelo calor e hibridizado com sondas de ácidos nucleicos, após a lavagem os espécimes são expostos à autoradiografia e o resultado é obtido após um a sete dias.

Estima-se que no mínimo 10.000 cópias de DNA de HPV por célula sejam necessárias para produzir uma positividade específica do ensaio.

A hibridização “in situ” com filtros foi amplamente utilizada nos estudos iniciais, porém induz a erros classificatórios dos tipos virais. Embora seja um teste de fácil realização, apresenta uma baixa especificidade e sensibilidade, sendo portanto inadequado para análise de infecção pelo HPV (DE VILLIERS et al., 1992; SCHIFFMAN, 1992b).

DE VILLIERS et al. (1987), em estudo de 9.295 esfregaços citológicos em que comparavam os achados citológicos com a hibridização “in situ” com filtro para os HPV 6/11 e 16/18 observaram que entre mulheres com citologias normais, o HPV foi identificado em torno de 10% entre mulheres de 15 a 50 anos, e 5% em idade acima de

50 anos. Entre as com citologias anormais, o HPV foi identificado em 30–40% independente da idade. A maior incidência das neoplasias intra-epiteliais ocorria vários anos após a infecção pelo HPV. Somente 1/3 das pacientes HPV positivas permaneciam positivas no seguimento, sugerindo a baixa sensibilidade do teste utilizado, subestimando a taxa real da infecção pelo HPV.

REEVES et al. (1989), em estudo caso controle multicêntrico, na América Latina, avaliaram 759 casos de carcinoma cervical invasor e 1.467 controles randomizados. O DNA do HPV foi detectado pela técnica de hibridização com filtro e obtiveram positividade para o DNA do HPV em 62% dos casos e 32% dos controles. A infecção do HPV 16/18 foi a mais freqüentemente associada com câncer cervical.

Reação Em Cadeia Da Polimerase (PCR)

A PCR é um método poderoso para amplificação de quantidades mínimas de seqüências específicas de DNA alvo, em milhões de vezes. Para que isto ocorra, é necessário que a seqüência de nucleotídeos alvos sejam conhecidos de modo que gerem iniciadores (primers) de oligonucleotídeos de 20 a 25 pares de base de comprimento, que fazem o pareamento em regiões específicas do DNA alvo. Após o pareamento ou anelamento desse sistema iniciador, uma enzima, a DNA polimerase termoestável, utiliza os resultantes do pareamento (fita dupla de bases) para iniciar 35 a 40 ciclos de cópias desses modelos. A concentração de DNA alvo cresce exponencialmente. Desta forma, 10 a 100 moléculas de DNA alvo podem ser amplificadas. Uma vez amplificado o DNA, poderá ser ele identificado pela eletroforese

em gel, utilizando brometo de ethidium ou através da utilização de sondas marcadas Southern Blot ou Dot Blot.

Os sistemas iniciadores (primers) podem ser do tipo específico, detectando um tipo simples de HPV, ou iniciadores gerais ou genéricos, que podem detectar um painel de diferentes tipos de HPV em uma única reação. Portanto, o tipo de HPV a ser identificado depende do sistema iniciador utilizado (REID; LÖRINCZ, 1995).

Resultados falso positivos de amplificação de DNA HPV contaminantes introduzidos por materiais, ocorreram no início da utilização deste método, porém a utilização de novas técnicas de esterilização corrigiram esta situação (SCHIFFMAN et al., 1991).

WALBOOMERS et al. (1995) ao avaliarem o valor da detecção do DNA do HPV em arquivos de citologias falso negativas de 18 mulheres cujos diagnósticos de carcinoma invasor se deram até 6 anos após o diagnóstico citológico, observaram o DNA do HPV foi identificado por PCR em 16 mulheres, os tipos 16/18 foram os que predominaram nestes esfregaços. Em 15 destas pacientes, o mesmo tipo viral foi achado tanto em estudo citológico como histológico. Dois esfregaços foram considerados inadequados para análise citológica e hibridização molecular. Concluíram que tipos virais de alto poder oncogênico podem ser detectados em arquivos de citologias falso negativas e que a utilização de métodos moleculares poderá diminuir a limitação da citologia.

A sensibilidade do PCR resulta do aumento da capacidade tipificadora comparada com outros métodos de detecção (MALKERT; HOPMAN; BLULE, 1993; TROFATTER Jr., 1997).

Para a identificação dos produtos específicos amplificados podem ser utilizadas várias técnicas. Separados em gel de agarose e aplicados sobre filtro, como na técnica de Southern Blot; ou aplicados diretamente sobre o filtro de nitrocelulose como no Dot Blot; ou transferidos para as placas Elisa revestidos de estreptavidina, sendo utilizadas diferentes sondas de diferentes sistemas de PCR (ZAHM; NINDL; SCHNEIDER, 1999).

KALANTARI et al. (1997), ao estudarem a relação dos achados de HPV com o grau da neoplasia intra-epitelial cervical através da utilização da PCR obtiveram nos NIC I uma positividade de 71% sendo o HPV 6 e 16 igualmente freqüentes; nos NIC II o HPV 16 foi o mais encontrado e o tipo 6 somente em 7,5% nos NIC III também foi o HPV 16 o mais encontrado, seguido do tipo 33. A concomitância de vários tipos virais foi freqüentemente encontrada em todos os grupos.

Solução De Hibridização (Captura Híbrida)

A solução de hibridização é uma das mais antigas metodologias de hibridização de ácidos nucléicos, na qual a separação dos duplexes era realizada por cromatografia das sondas não pareadas.

Após 1975, com a utilização do filtro por Southern este método passou ao desuso. Com o desenvolvimento de novas tecnologias com ácidos nucléicos, reviveram os ensaios com solução de hibridização. Recentemente, uma forma de solução de hibridização chamada de ensaio de Captura Híbrida tornou-se disponível, onde o DNA celular é isolado, desnaturado e hibridizado com sondas de RNA. Estes híbridos são capturados da solução por anticorpos RNA/DNA específicos e colocados na superfície

do tubo. A obtenção do resultado se dá pela reação dos híbridos com um substrato quimioluminiscente, que ao emitir luz é quantificado pelo aparelho denominado luminômetro.

Este sistema é capaz de promover a quantificação e tipificação dos DNA de HPV envolvidos na amostra. Uma nova versão do sistema de Captura Híbrida, chamada de Captura Híbrida em Micro-placa promoveu um aumento da sensibilidade, tornando o procedimento mais fácil no seu processamento. Neste novo teste, houve a substituição do tubo de captura por micro-placa e acrescentaram-se novas sondas de HPV de alto risco. Com a adição dessas novas sondas pode-se detectar 13 diferentes tipos de HPV carcinogênico, os quais representam virtualmente os tipos de HPV oncogênicos conhecidos até o momento (LÖRINCZ, 1992; LÖRINCZ, 1996a e b).

FARTHING et al. (1994), avaliaram a possibilidade de uso clínico da captura híbrida na detecção do Papiloma Vírus Humano. Analisaram 60 pacientes quanto à presença de vírus oncogênico na cérvix uterina utilizando captura híbrida e comparando-os à PCR. Obtiveram 86% de concordância diagnóstica, sendo 83% nos NIC III, 62% nos NIC II, 59% nos NIC I e 21% nos casos controles cujas citologias não apresentavam lesões pré-carcinomas. Concluíram que a captura híbrida é um método fácil, prático, sensível, podendo ser utilizada no uso clínico. Apresenta uma sensibilidade maior que a citologia oncológica e poderá ser uma ferramenta útil na redução dos diagnósticos falso negativos citológicos.

HATCH; SCHNEIDER; ABDEL-NOUR (1995), utilizaram a captura híbrida na detecção de vírus HPV de risco intermediário e alto risco, como fator de triagem antes da colposcopia. Analisaram 311 pacientes que apresentavam citologias anormais com

captura híbrida, colposcopia, biópsia e histologia. A sensibilidade da captura híbrida na detecção de lesões de alto grau foi de 74%, quando utilizada sozinha. Essa sensibilidade aumentou para 91% quando utilizada em conjunto com a citologia oncológica. A captura híbrida mostrou-se com sensibilidade superior, quando utilizada sozinha na detecção das lesões que continham vírus de risco intermediário e de alto risco.

TAROMARU; GALLO; DORES (1998) correlacionando as duas gerações de captura híbrida analisaram 518 amostras pelos dois métodos (tubo e microplaca). Houve uma concordância diagnóstica de 72%, tendo a nova técnica em microplaca um aumento de 26,1% nos diagnósticos, refletindo a sua maior sensibilidade.

MC GOOGAN; SEAGAR; CUBIE (1998), avaliaram 156 citologias arquivadas por 12 a 13 anos. Na pesquisa de vírus HPV de alto risco utilizaram a captura híbrida e a PCR. Das 148 amostras testadas com captura híbrida 20 (13,5%) apresentaram vírus de alto risco, 98 foram testadas pela PCR e 32 (32,7%) foram positivas para o vírus de alto risco. Um total de 51 casos foram detectados por ambos os métodos. De 98 amostras testadas por ambos os métodos houve concordância em 54 (55,1%). Concluíram que ambos os métodos podem ser utilizados na pesquisa de vírus de HPV em citologias de arquivo.

WOMACK et al. (2000) ao avaliarem a utilização do ensaio de Captura Híbrida em micro-placa para HPV de alto risco em 2140 mulheres entre 25 e 55 anos do programa de prevenção do Zimbábue encontraram sensibilidade de 81% nas lesões de alto grau (CI 75%-86%) e 64% nas lesões de baixo grau. Em relação à especificidade 62% (CI 59%-64%) nas lesões de alto grau e de 65% (CI 62%- 67%). O valor preditivo

foi de 19% (CI 17%- 22%) para lesões de alto grau e 39% (CI 26%-42%) para lesões de baixo grau. Concluem que na detecção de lesões de alto grau, a Captura Híbrida mostrou-se com uma alta sensibilidade mas especificidade relativamente baixa.

CUZICK (2000) e SCHIFFMAN et al. (2000) ao avaliarem o teste de detecção do DNA do HPV por Captura Híbrida como um método de screening alternativo concluem que o teste de captura híbrida tem sensibilidade maior ou igual ao da citologia oncológica. A citologia oncológica mostrou estatisticamente maior especificidade, sugerindo a introdução da captura híbrida como um teste no screening primário na prevenção de lesões cervicais.

COLPOSCOPIA

A avaliação colposcópica tem duas funções primordiais no atual desenvolvimento científico e tecnológico. O primeiro continua sendo o seu valor diagnóstico na avaliação dos epitélios envolvidos na oncogênese cervical como idealizado por Hinselmann; o segundo é de assumir o papel de avaliação orientadora na presença de um epitélio de transformação imaturo ou desviado do normal (MOSSETI; DE PALO, 1993).

Colposcopia – Evolução

Até chegarmos ao estágio atual de conhecimento colposcópico, houve várias modificações de conceitos e classificações.

Hinselmann inicialmente reconheceu somente alguns achados colposcópicos, os quais foram divididos em duas categorias, achados normais e os patológicos.

1 - ACHADOS NORMAIS

Mucosa original

Ectopia

Zona de Transformação

2 – ACHADOS PATOLÓGICOS

Leucoplakia

Base de Leucoplakia (pontilhado)

Mosaico

Ao remover as placas de queratina das superfícies das leucoplakias, encontrou uma superfície ricamente vascularizada que passou a chamar de base de leucoplasia, também identificou os mosaicos, crendo que eles estavam associados às leucoplakias.

Acreditava que esses achados colposcópicos eram o caminho que levava ao carcinoma cervical, denominando-os de “Área Matrix”. Mais tarde reconheceu a existência da zona de transformação atípica descrita por Treite, a qual chamou de “Zona de Transformação Anormal”.

Posteriormente, Wespi, com a sua nomenclatura distinguia pela primeira vez as diferenças existentes entre as leucoplakias, pontilhados e mosaicos. Introduziu o conceito de área iodo negativa colposcopicamente não identificável ou “iodo muda”.

WESPI (1949), dividiu os achados colposcópicos em quatro grupos:

1 – Aparência normal da “Portio”

Mucosa original

Ectopia

Zona de transformação

2 – Carcinoma da “Portio “

3 – Epitélio atípico da “Portio”

Leucoplakia

Base de leucoplakia

Mosaico

Área iodo negativa “Muda”

4– Achados de significado Indeterminados

Segundo citado por BURGHARDT (1991a), foi durante o II CONGRESSO MUNDIAL DE PATOLOGIA CERVICAL E COLPOSCOPIA em Graz (Áustria) 1975, que o Comitê Internacional de Terminologia Colposcópica formulou a proposta de uma nova nomenclatura. As atenções estavam voltadas em conciliar as diferentes interpretações dos vários achados colposcópicos com uma terminologia que fosse internacionalmente aceita. Com particular preocupação em adotar termos que pudessem ser traduzidos na maioria dos idiomas, sem ambigüidade. Foi de consenso a troca do termo “Base de Leucoplakia” por pontilhado; de “Leucoplakia” por keratosis. Nesta nova sistematização do exame colposcópico, o teste de Schiller passou a não ser rotina obrigatória do exame colposcópico.

Permaneceram controvérsias sobre o conceito de “zona de transformação atípica”.

Nos países de língua inglesa os termos mosaico, pontilhado, epitélio branco, keratosis e vasos atípicos foram aceitos, porém, na Europa, a zona de transformação atípica foi meramente um termo adicional a outros de significado similar.

A Classificação de Graz foi definida como se segue:

CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DE GRAZ (1975)

I – ACHADOS COLPOSCÓPICOS NORMAIS

Epitélio escamoso original

Epitélio colunar (ectopia)

Zona de transformação

II – ACHADOS COLPOSCÓPICOS ANORMAIS

A – Zona De Transformação Atípica

Mosaico

Pontilhado

Epitélio Aceto Branco

Keratosis

Vasos Atípicos

B – Suspeito De Carcinoma Invasor

III – ACHADOS COLPOSCÓPICOS INSATISFATÓRIOS

IV – MISCELÂNEIA DE ACHADOS

A – Alterações inflamatórias

B – Alterações Atróficas

C – Erosão

D – Condiloma

E – Papiloma

F – Outros

A não aceitação da classificação de Graz, principalmente pelos europeus, pois permaneceram questionamentos sobre a zona de transformação atípica, da não utilização do teste de Schiller como parte obrigatória do exame colposcópico, assim como da não valorização da reação epitelial ao ácido acético, levou a escola Européia a uma proposta de uma nova classificação.

PROPOSTA DA CLASSIFICAÇÃO EUROPÉIA

(BURGHARDT, 1989)

ACHADOS NORMAIS

Epitélio escamoso original

Epitélio colunar (ectopia)

Transformação normal

ACHADOS ANORMAIS

GRAU 0 - Zona não suspeita - Transformação rara

GRAU 1 - Zona duvidosa - Transformação rara

Mosaico simples

Pontilhado fino

Leucoplasia fina

Erosão

GRAU 2 - Zona suspeita - Transformação rara

Mosaico grosseiro

Leucoplasia espessa

Vascularização irregular

Úlcera

CÂNCER FRACAMENTE INVASOR

ASPECTO CONDILOMATOSO

MISCELÂNEA

ACHADOS INCONCLUSIVOS

Segundo BURGHARDT, citado por BURGHARDT (1991b), por ocasião do VI CONGRESSO MUNDIAL DE PATOLOGIA CERVICAL E COLPOSCOPIA realizado em São Paulo (1987), foi formado um grupo de trabalho para uma nova classificação colposcópica para ser apresentada no Congresso de Roma (1990). O grupo da escola

Européia propôs a classificação de Burghardt, que não foi aceita, tendo sido aprovada a classificação que vigora até os dias atuais.

CLASSIFICAÇÃO DE ROMA (1990)

I – ACHADOS COLPOSCÓPICOS NORMAIS

Epitélio escamoso original

Epitélio colunar

Zona de transformação normal

II – ACHADOS COLPOSCÓPICOS ANORMAIS

A – DENTRO DA ZONA DE TRANSFORMAÇÃO

1 – Epitélio acetobranco*

a) – Plano. b) – Micropapilar

2 – Pontilhado

3 – Mosaico*

4 – Leucoplasia*

5 – Área iodo negativa

6 – Vasos atípicos

B – FORA DA ZONA DE TRANSFORMAÇÃO

1 – Epitélio acetobranco*

a) – Plano b) – Micropapilar

2 – Pontilhado*

3 – Mosaico*

4 – Leucoplasia*

5 – Área iodo negativa

6 – Vasos atípicos

III – ÁREAS COLPOSCOPICAMENTE SUSPEITAS DE CARCINOMA INVASOR

IV – COLPOSCOPIA INSATISFATÓRIA

A – Junção Escamo Colunar Não Visível

B – Severa Inflamação Ou Atrofia

C – Colo Não Visível

VI – MISCELÂNEA

A – Superfície Micropapilar Não Acetobranca

B – Condiloma Exofítico

C – Inflamação

D – Atrofia

E – Úlceras

F – Outras

* Indicadores de alterações maiores e menores

ALTERAÇÕES MENORES

Epitélio Aceto branco tênue

Mosaico fino, regular

Pontilhado fino

Leucoplasia plana

ALTERAÇÕES MAIORES

Epitélio Aceto branco denso

Mosaico denso, irregular

pontilhado grosseiro

Leucoplasia espessa

Erosões e vasos atípicos

Na tentativa de diferenciação dos vários achados colposcópicos, principalmente entre as lesões de baixo e alto grau citológicas, vários índices colposcópicos foram utilizados, sendo o de REID et al. (1984) o internacionalmente conhecido.

REID et al. (1984), ao avaliarem 52 mulheres que apresentavam alterações citológicas de displasia, através da colposcopia, utilizaram o índice colposcópico, o qual se baseia na avaliação quantitativa da reação do epitélio cervical ao iodo e ao ácido acético dos contornos e espessura das lesões e da presença de atipia vascular, comparando os resultados obtidos pela avaliação colposcópica com os achados histológicos, concluíram que estes cinco critérios colposcópicos estavam significativamente correlacionados com a severidade histológica da lesão. E que as diferenças de cor, a presença de atipias vasculares e reação ao iodo eram mais preditivas que a espessura e os contornos das lesões. Obtiveram uma acuracidade de 96% com este método.

4 SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo transversal de 130 mulheres de clínica privada de Curitiba, que apresentavam laudo citológico de lesão de baixo grau segundo os critérios da classificação de Bethesda, no período de novembro de 1997 a abril de 1999. A tipificação e quantificação do HPV foram realizadas pela técnica de captura híbrida em micro-placa, usando-se kit de coleta da Digene Corporation®.

A avaliação colposcópica foi realizada com vídeo-colposcópio Vasconcellos utilizando-se o índice de gravidade colposcópico criado para este estudo.

As informações sobre variáveis epidemiológicas foram retiradas dos prontuários daquelas pacientes, onde um protocolo para coleta de dados previamente estabelecido foi preenchido (Anexo 1).

Em todas as mulheres procedeu-se uma explicação detalhada sobre os métodos propedêuticos a serem utilizados, sua importância na sequência da investigação, e que elas fariam parte de um grupo de estudo.

Solicitou-se às pacientes a leitura e assinatura do “Termo de Consentimento Informado” (Anexo 2).

4.2 CRITÉRIOS E PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DOS CASOS

Foram incluídas no presente estudo mulheres:

1. De qualquer idade, com laudo citológico de lesão de baixo grau segundo os critérios do Sistema Bethesda.
2. Que não apresentassem laudo citológico de ASCUS e/ou AGUS. (alteração escamosa de significado indeterminado e/ou alteração glandular de significado indeterminado).
3. O material coletado tanto para citologia oncológica, quanto para a captura híbrida, seguiram a mesma técnica de coleta.
4. Que não estivessem grávidas.
5. Que estivessem de acordo com as condições do estudo e tivessem assinado o termo de consentimento informado.

4.3 CRITÉRIOS PARA COLETA DA CITOLOGIA ONCOLÓGICA

Todo material coletado para citologia oncológica obedeceu aos seguintes critérios:

- 1 - A paciente não deveria estar menstruada.
- 2 - Ter tido um período de abstinência sexual de 24 horas antes da coleta.
- 3 - Não ter usado duchas, cremes ou óvulos vaginais nas 48 horas que antecederem o procedimento da coleta.
- 4 - Foi utilizado na execução da coleta material descartável (luvas, espécule, pinça, algodão, espátula de Ayre, escova endocervical), exceto a lâmina de vidro.

5 - Os esfregaços foram realizados procedendo-se coleta dupla em lâmina única. A lâmina continha uma das extremidades fosca para que fosse realizada a identificação com as iniciais da paciente e o número da requisição utilizando-se grafite, evitando assim a possibilidade de troca de material.

6 - Paciente em posição ginecológica.

7- O examinador calça as luvas descartáveis evitando assim a sua contaminação e a infecção cruzada.

8 - Introdução do espéculo vaginal e exposição do colo uterino.

9 - Com a espátula de Ayre introduz-se a parte mais longa no orifício externo do colo uterino, observando que ela alcance toda zona de transformação girando-se cuidadosamente 360 graus.

10 - Iniciar o esfregaço próximo à borda fosca da lâmina no sentido vertical, de cima para baixo, depositando sobre a lâmina o material coletado (espátula de Ayre-ectocérvice).

11 - Despreza-se a espátula.

12 - A escova endocervical foi introduzida no canal endocervical e gira-se 360 graus.

13 - Complementa-se o esfregaço iniciando-se na metade da lâmina no sentido horizontal, rodando-se a escova no sentido contrário ao da coleta; cuidando-se para não sobrepor o esfregaço com o anterior (escova endocervical – endocérvice).

14 - Despreza-se a escova endocervical.

15 - Fixa-se imediatamente o esfregaço através da imersão da lâmina em álcool absoluto no meio de transporte.

16 - Preenche-se a requisição da citologia observando a adequada identificação da paciente e dados clínicos relevantes ao citopatologista.

4.4 CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO CITOLÓGICA

Os critérios citológicos adotados foram os da terminologia do Sistema Bethesda 1991:

ADEQUAÇÃO DO ESPÉCIME

Além da necessidade de uma identificação adequada da amostra, com a identificação própria da paciente que permitisse ao laboratório de citopatologia localizar registros prévios que pudesse influenciar na avaliação corrente, procedeu-se o preenchimento adequado da requisição contendo dados clínicos relevantes.

A interpretação técnica da composição celular do esfregaço foi realizada por avaliação diagnóstica utilizando-se o Sistema Bethesda como critério.

O Sistema Bethesda define esfregaço satisfatório quando ele contém boa representatividade de células escamosas e células glandulares endocervicais ou células escamosas metaplásicas.

Essa representatividade celular forma a base microscópica para a hipótese de que a zona de transformação do colo uterino esteja representada.

Um esfregaço adequado deve conter um mínimo de células epiteliais escamosas bem preservadas e bem visualizadas, que devem cobrir 10% da superfície da lâmina e um adequado componente celular endocervical ou celular escamoso metaplásico que,

no mínimo, deve conter dois grupamentos celulares bem preservados de pelo menos 5 células.

As citologias com laudo “insatisfatório e satisfatório mas limitados “ por qualquer um dos fatores abaixo relacionados foram repetidas após tratamento e/ou correção dos aspectos técnicos:

- 1 - Falta de informação pertinente à paciente;
- 2 - Esfregaço hemorrágico, inflamatório, artefato de coleta ou de fixação;
- 3 - Ausência de representatividade da zona de transformação (componentes da ecto e endocérvice ou metaplásico).

DIAGNÓSTICO DESCRITIVO

Alterações celulares benignas

Infecção

Trichomonas vaginalis

Organismos fúngicos morfológicamente compatíveis com *Cândida* sp.

Bactérias morfológicas compatíveis com *Actinomyces* spp.

Alterações celulares associadas com o vírus Herpes Simples

Outras.

Alterações reativas

Alterações celulares reativas associadas com:

Inflamação (incluindo reparo típico)

Atrofia com inflamação (vaginite atrófica)

Radiação

Dispositivo intra uterino (DIU)

ANORMALIDADE DAS CÉLULAS EPITELIAIS

Células escamosas

Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS)

Quantificar*

Lesão escamosa intra epitelial de baixo grau (LSIL)

Abrangendo: Papilomavírus humano (HPV)**

Displasia Leve/NIC I (neoplasia intra epitelial cervical I)

Lesão escamosa intra epitelial de alto grau (HSIL)

Abrangendo: Displasia moderada, displasia acentuada, (NICII /NIC III)

Carcinoma de células escamosas

Células Glandulares

Células endometriais citologicamente benignas em uma mulher na pós menopausa

Células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGUS). Qualificar*

Adenocarcinoma endocervical

Adenocarcinoma "in situ"

* Alterações celulares do papilomavírus humano anteriormente conhecida como coilocitose, atipia coilocitótica ou condilomatosa, estão incluídas na categoria de lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau.

** Células atípicas escamosas ou glandulares de significado indeterminado deveriam ser classificadas como se um processo reativo ou pré maligno / maligno estivesse favorecido.

Adenocarcinoma endometrial

Adenocarcinoma extra uterino

Adenocarcinoma

Outros neoplasmas malignos (especificar)

AVALIAÇÃO HORMONAL (Aplica-se apenas para esfregaços vaginais)

Padrão hormonal compatível com a idade e a história

Padrão hormonal incompatível com a idade e a história (especificar)

Avaliação hormonal impossível devido a: (especificar)

4.5 CRITÉRIOS PARA COLETA DA CAPTURA HÍBRIDA

Todo material coletado para captura híbrida obedeceu aos seguintes critérios:

- 1 - A paciente não deveria estar menstruada.
- 2 - Ter tido um período de abstinência sexual de 24 horas antes da coleta.
- 3 - Não ter usado duchas, cremes ou óvulos vaginais nas 48 horas que antecederem o procedimento da coleta.
- 4 - Todo material utilizado na execução da coleta era material descartável (luvas, espéculos, pinças e algodão).
- 5 - Paciente em posição ginecológica.
- 6 - O examinador calça as luvas evitando assim a sua contaminação e a infecção cruzada.
- 7 - Introdução do espéculo vaginal e exposição do colo uterino.

8 - Retirada do excesso de muco cervical do orifício cervical e do fundo de saco vaginal com algodão.

9 - Introdução da escova de coleta da captura híbrida 1,0 a 1,5 cm no canal endocervical, girando-se três vezes, no sentido horário, observando a não introdução total da escova no canal endocervical.

10 - Colocação da escova no meio de transporte quebrando-se a parte excedente da haste.

11 - Fechamento do tubo, homogeneização do material coletado através de movimentos circulares.

12 - Preenchimento da requisição do exame observando-se o adequado preenchimento da identificação da paciente e dos dados clínicos relevantes ao laboratório.

4.6 CRITÉRIOS PARA TIPIFICAR E QUANTIFICAR O DNA DO HPV POR CAPTURA HÍBRIDA EM MICRO-PLACA

PRINCÍPIOS DO MÉTODO:

A captura híbrida é um imunoensaio, não radioativo, que usa sondas de RNA para detectar fita única de DNA alvo.

É um teste molecular de amplificação de sinal para a detecção de alvos como o DNA e/ou RNA “in vitro”.

Baseia-se no princípio da hibridização, capacidade apresentada pelas moléculas de DNA de se ligarem, quando desnaturadas, a outros fragmentos de DNA/RNA complementares, formando assim híbridos DNA/DNA ou DNA/RNA.

A amostra coletada do colo uterino e vagina contendo DNA-HPV foi colocada em uma solução de desnaturação, a qual provocou a quebra da dupla hélice do DNA viral. Seguiu-se uma reação de hibridização com sondas de RNA-HPV não marcadas. As sondas utilizadas são de RNA-HPV contendo 8000 pares de bases, o que corresponde a toda extensão do genoma do vírus HPV.

Os híbridos assim formados DNA/RNA foram capturados sobre a superfície de uma micro-placa recoberta por anticorpos específicos para esses híbridos (DNA/RNA – HPV). A esses híbridos imobilizados na micro-placa ligou-se um segundo grupo de anticorpos, estes conjugados à enzima fosfatase alcalina.

Inúmeras moléculas de fosfatase alcalina que estão ligadas a uma molécula do segundo anticorpo e milhares de moléculas do segundo anticorpo ligam-se a uma molécula do híbrido imobilizado na micro-placa (fase de amplificação do sinal).

Na fase final do procedimento acrescentou-se o substrato quimioluminescente que é o Dioxietano, o qual foi hidrolizado pela fosfatase alcalina do conjugado liberando fótons de luz que foram captados e medidos pelo luminômetro na forma de unidades de luz relativa (RLU).

A presença do DNA-HPV é proporcional à intensidade de luz emitida.

A cada 1pg DNA/ml corresponde a 0,1 cópias de vírus/célula.

Basicamente a técnica pode ser resumida em cinco fases:

1- Desnaturação (desnaturação do espécime)

- 2- Hibridização (hibridização com sondas de RNA)
- 3- Captura (captura dos híbridos em micro-placa)
- 4- Conjugação (reação com os conjugados)
- 5- Detecção (amplificação do sinal por quimioluminescência)

É um método quantitativo, pois é um método de amplificação do sinal e não da amostra.

CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL UTILIZADO:

1 - As sondas de RNA utilizadas na técnica de captura híbrida contém 8000 pares de bases nucleotídicas, o que corresponde a toda extensão do genoma viral (HPV), sendo específico para tipos não oncogênicos (6, 11, 42, 43, 44) e tipos oncogênicos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68).

2 - As sondas de RNA são mais específicas porque só codificam regiões de “exons” do genoma viral. Exons: são as regiões codificantes do gene.

3 - O uso de sondas de RNA evita reações de reanelamento com a própria sonda, o que pode ocorrer quando se utiliza sondas de DNA.

4 - Os anticorpos utilizados foram monoclonais.

5 - Não foi necessária a purificação ou diluição da amostra para processamento.

Critérios Para A Avaliação Da Presença E O Tipo Viral Envolvido Na Amostra

Foram evidenciadas quatro situações :

- 1 - Vírus não identificado (A0, B0).

2 - Presença de vírus do grupo A (não oncogênico) e ausência de vírus do grupo B (oncogênico). (A1 B0).

3 - Presença de vírus dos grupos A e B (A1 B1).

4 - Ausência de vírus do grupo A e presença de vírus do grupo B. (A0 B1).

Critérios Para A Avaliação Da Quantidade Viral

Foram utilizados os seguintes critérios :

1 - Foram considerados exames negativos os que apresentaram a relação RLU/PCA para os vírus A (tipo não oncogênico) e RLU/PCB para os vírus B (tipo oncogênico) valores menores que 1(hum)/pg/ml. de DNA – HPV (RLU: Unidade de luz relativa) (A0 B0).

2 - Foram considerados positivos os que apresentaram a relação RLU/PCA e ou RLU/PCB valores ≥ 1 pg/ml de DNA – HPV. (A1 B0),(A0 B1), (A1 B1).

4.7 CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO COLPOSCÓPICA

A avaliação colposcópica foi realizada rotineiramente pelo mesmo colposcopista, que utilizou vídeo-colposcópio Vasconcellos com 5 aumentos e adotou os seguintes critérios na execução do procedimento.

CrITÉRIOS TÉCNICOS DA COLPOSCÓPIA

1 - Após a coleta do material para captura híbrida, embrocou-se o colo uterino com soro fisiológico e procedeu-se a primeira inspeção colposcópica.

2 - A segunda observação colposcópica se deu após a limpeza do colo uterino e dos fÓrnices vaginais com solução aquosa de ácido acético a 3%. Nela procurou-se identificar a zona de transformação, da presença ou não de alterações maiores e menores colposcópicas e a sua localização (se fora ou dentro da zona de transformação).

3 - Embrocou-se a vagina e colo uterino com solução iodo iodetada de Schiller, valorizando as variações de tonalidades do lugol.

4 - Descoloração da vagina e colo uterino com solução de bissulfito de sÓdio a 5%.

5 - Nova avaliação colposcópica.

6 - Para quantificar as alterações colposcópicas encontradas foi criado um índice denominado de Índice de Gravidade Colposcópico Simplificado (IGCS), atribuindo-se valores de acordo com o tipo e localização das lesões.

CrITÉRIOS PARA LOCALIZAÇÃO DA LESÃO COLPOSCÓPICA

ZONA DE TRANSFORMAÇÃO

Entende-se como zona de transformação, a região do colo uterino onde o epitélio da endocérvice (epitélio cilíndrico) acha-se evertido ou ectopiado, sendo substituído por

epitélio poliestratificado pavimentoso. Este mecanismo de substituição é conhecido como metaplasia escamosa.

ALTERAÇÕES MENORES COLPOSCÓPICAS OU GRAU 1

Como definido na Classificação Internacional aprovada pela International Federative for Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC) em Roma 1990:

- Epitélio aceto branco plano, fino (tênue)
- Leucoplasia plana (mancha tênue)
- Pontilhado fino (regular)
- Mosaico regular, simples (campos simétricos)

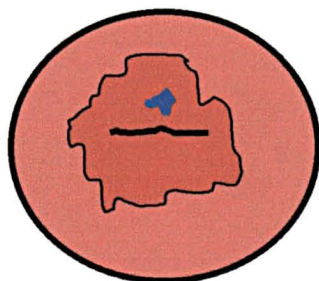
ALTERAÇÕES MAIORES COLPOSCÓPICAS OU GRAU 2

- Epitélio aceto branco espessado (com relevo)
- Leucoplasia espessada (verrucosa)
- Mosaico de campos irregulares (assimétricos)
- Pontilhado grosseiro (irregular)
- Vasos atípicos (bizarros)
- Orifícios glandulares ceratinizados (com orla em colarinho)

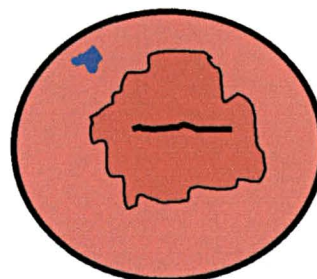
LOCALIZAÇÃO DOS ACHADOS COLPOSCÓPICOS

As alterações colposcópicas maiores e menores foram classificadas em dois grupos: dentro e fora da zona de transformação.

Figura 1 – Localização dos Achados Colposcópicos



Dentro da zona de transformação



Fora da zona de transformação

Em todas as avaliações colposcópicas utilizamos o Índice de Gravidade Colposcópico Simplificado que, através da utilização de score (nota) auferida pelo examinador, propõem-se a quantificar topograficamente os achados colposcópicos. Utilizamos o critério de centralização, ou seja, quanto maior e mais perto da junção escamo colunar original maior o índice de gravidade, como segue:

Quadro 1 - ÍNDICE DE GRAVIDADE COLPOSCÓPICO SIMPLIFICADO (IGCS)

CARACTERÍSTICAS DA LESÃO	NOTA
Ausência de lesão colposcopicamente identificável	1
Alterações menores colposcópicas, fora da Zona de transformação	2
Alterações menores colposcópicas, dentro da Zona de transformação	3
Alterações maiores colposcópicas, fora da Zona de transformação	4
Alterações maiores colposcópicas, dentro da Zona de transformação	5

4.8 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS

a) IDADE:

As pacientes foram divididas em dois grupos: de 10 a 29 anos e ≥ 30 anos.

b) PARIDADE:

Em relação à paridade divididas em dois grupos: de 0 a 1 e mais de 2 filhos.

c) NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAIS:

Baseado na história sexual, o número de parceiros sexuais foi dividido em parceiro único e dois ou mais.

d) TABAGISMO:

Em relação ao fumo a amostra foi dividida em dois grupos, fumantes e não fumantes.

e) MÉTODOS ANTICONCEPCIONAIS:

Os métodos anticoncepcionais utilizados pelas mulheres do grupo de estudo foram divididos em três grupos, métodos hormonais (anovulatórios orais e injetáveis),

método de barreira (preservativo masculino/feminino e diafragma) e outros métodos (DIU, laqueadura, nenhum método e método natural).

f) IDADE DO PRIMEIRO COITO:

Quanto à idade do primeiro coito foi dividido em dois grupos, de 10 a 19 e de 20 a 32 anos.

4.9 CRITÉRIOS DE COMPARAÇÃO ENTRE TIPO VIRAL E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS

Comparou-se o tipo de vírus encontrado na amostra (A1 B0) – não oncogênico, (A0 B1) – oncogênico ou (A1 B1) – presença dos dois tipos virais com as variáveis epidemiológicas.

4.10 CRITÉRIOS DE COMPARAÇÃO ENTRE TIPO, QUANTIDADE VIRAL E GRAVIDADE DAS LESÕES COLPOSCÓPICAS

Comparou-se cada tipo e quantidade de vírus encontrado na amostra (A, B, AB) com os achados colposcópicos definidos pela nota obtida através do Índice de Gravidade Colposcópica Simplificado.

4.11 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os dados relativos às variáveis epidemiológicas são apresentados em frequências, e as comparações através do teste de χ^2 (qui quadrado).

Para quantificar os achados colposcópicos, o “índice colposcópico” foi transformado para $\sqrt{x + 0,5}$ (raiz quadrada do índice colposcópico adicionado de 0,5), e os dados assim transformados foram analisados através da correlação que teve seu valor testado através do teste “t” de Student.

Com os dados do índice colposcópico devidamente transformados, foi realizada uma análise de variância (Anova), segundo o esquema fatorial “2 x 2”, apresentando portanto quatro grupos: negativo para ambos os vírus (A0, B0); negativo para vírus A e positivo para vírus B (A0, B1); positivo para vírus A e negativo para vírus B (A1, B0) e, finalmente, positivo para ambos os vírus (A1, B1).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com diferentes números de repetições.

5 RESULTADOS

5.1 DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL EM MULHERES COM CITOLOGIA ONCÓTICA DE BAIXO GRAU

Das 130 mulheres que participaram do grupo de estudo, em apenas 2% (3 casos) da amostra não foi identificada a presença de DNA-HPV pesquisados (A0,B0).

Quase dois terços da amostra (61,5%) foi representado por mulheres que apresentaram os dois tipos virais (A1, B1).

Pouco mais de um terço da amostra (47 casos) foi identificado somente um tipo viral, não oncogênico ou oncogênico (Tabela 1).

Tabela 1 - PREVALÊNCIA DA POSITIVIDADE DO TIPO VIRAL DE HPV PESQUISADO POR CAPTURA HÍBRIDA EM MICRO-PLACA EM MULHERES COM CITOLOGIA ONCÓTICA DE BAIXO GRAU

RESULTADO	TIPO VIRAL			
	A1 B0	A0 B1	A1 B1	A0 B0
≥ 1	10 (7,5%)	37 (28,5%)	80 (61,5%)	3 (2,5%)
PREVALÊNCIA	7,5 %	28,5 %	61,5 %	00000011 2,5%

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS VIRAIS E VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS

Idade

A idade das mulheres que participaram do grupo de estudo variou entre 15 a 61 anos, sendo que, 68 casos (53%) foi representado pelo grupo de mulheres jovens entre 15 a 29 anos.

Das mulheres até 29 anos, 60 casos (88%) apresentaram vírus tipo oncogênico (A₀, B₁) ou associação destes (A₁, B₁), e somente em 8 casos (12%) foi evidenciada a presença de vírus não oncogênico isolado (A₁, B₀).

Importante ressaltar que, entre as mulheres acima de 30 anos, 57 casos (96%) foram representados por casos de positividade para vírus oncogênico isolado (A₀, B₁) ou associação destes (A₁, B₁).

Não houve diferença significativa entre os grupos na distribuição percentual do tipo viral e idade (Tabela 2).

Tabela 2 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO RELACIONANDO-SE COM A IDADE

IDADE/ANOS	TIPO VIRAL			TOTAL (n)
	A	B	AB	
15 - 29	8 (80,0%)	15 (40,5%)	45 (56,0%)	68
≥ 30	2 (20,0%)	22 (59,5%)	35 (44,0%)	59
TOTAL (n)	10 100,0%	37 100,0%	80 100,0%	127 100,0%

P=NS

Paridade

A maioria da amostra, 109 casos (68%), foi representada por mulheres de baixa paridade 0 a 1 filho.

Das mulheres que apresentaram vírus não oncogênico (A₁,B₀) quase a sua totalidade (90%) eram nulíparas ou de baixa paridade. Nas que apresentaram vírus oncogênico (A₀,B₁) também foi evidenciado um predomínio da nuliparidade ou baixa paridade (84%).

Entre as mulheres nas quais foi encontrada a associação dos dois tipos virais (A₁,B₁) também foi observada baixa paridade (86%).

A distribuição percentual do tipo viral de HPV não mostrou diferença significativa entre os grupo em relação à paridade (Tabela 3).

Tabela 3 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO À PARIDADE

PARIDADE	TIPO VIRAL			TOTAL (n)
	A1 B0	A0 B1	A1 B1	
0 – 1	9 (90,0%)	31 (84,0%)	69 (86,0%)	109
≥ 2	1 (10,0%)	6 (16,0%)	11 (14,0%)	18
TOTAL (n)	10 100,0%	37 100,0%	80 100,0%	127 100,0%

P =NS

Número De Parceiros Sexuais

A maioria da amostra, 82 casos (64%), apresentou dois ou mais parceiros sexuais.

Entre as mulheres com parceiro único 53%, (24 entre 45) apresentaram associação dos tipos virais (A1,B1).

Igualmente, as mulheres com dois ou mais parceiros sexuais, mais da metade da amostra 68% (56 entre 82) apresentou associação dos tipos virais (A1,B1), sendo que as demais apresentaram um dos tipos virais isolados.

Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao tipo viral encontrado na amostra e o número de parceiros sexuais das mulheres (Tabela 4).

Tabela 4 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO RELACIONANDO-SE COM O NÚMERO DE PARCEIROS SEXUAIS

Nº PARC.	TIPO VIRAL			TOTAL (n)
	A1 B0	A0 B1	A1 B1	
1	3 (30.0%)	18 (48,5%)	24 (30,0%)	45
≥ 2	7 (70.0%)	19 (51,5%)	56 (70,0%)	82
TOTAL (n)	10 100,0%	37 100,0%	80 100%	127 100,0%

P=NS

Fumo

Mais da metade da amostra (58%) foi representada por mulheres não fumantes. Entre elas 49 casos (61%) apresentaram associação dos dois tipos virais ((A1,B1).

Igualmente entre as fumantes, mais da metade das mulheres apresentaram associação dos tipos virais (A1,B1).

A distribuição percentual do tipo viral de HPV das mulheres com citologia de baixo grau, segundo apresentar ou não o hábito de fumar, não mostrou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 5).

Tabela 5 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO AO HÁBITO DE FUMAR

CONDIÇÃO	TIPO VIRAL			TOTAL (n)
	A1 B0	AO B1	A1 B1	
NÃO FUMANTE	6 (60,0%)	19 (51,5%)	49 (61,0%)	74
FUMANTE	4 (40,0%)	18 (48,5%)	31 (39,0%)	53
TOTAL (n)	10 100,0%	37 100,0%	80 100,0%	127 100,0%

P =NS

Métodos Anticoncepcionais

Mais da metade da amostra (63%) foi representada por mulheres que utilizavam métodos anticoncepcionais hormonais. Somente 10 casos utilizaram métodos de barreira quer masculino ou feminino, e 25 mulheres não utilizavam nenhum método anticoncepcional ou utilizavam métodos naturais.

Entre as mulheres que utilizavam métodos hormonais, em mais da metade (57%) foi encontrada associação dos tipos virais (A1,B1).

Nas que utilizavam métodos de barreira, 90% apresentaram a associação viral (A1,B1), assim como nas que utilizavam outros métodos anticoncepcionais 67% (25 mulheres) apresentaram a associação viral (A1 B1).

Não houve diferença entre os grupos na distribuição percentual do tipo viral de mulheres com citologia oncológica de baixo grau em relação ao método anticoncepcional utilizado (Tabela 6).

Tabela 6 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO AO MÉTODO ANTICONCEPCIONAL UTILIZADO

MÉTODO	TIPO VIRAL			TOTAL (n)
	A1 B0	A0 B1	A1 B1	
HORMONAIIS	9 (90,0%)	25 (67,5%)	46 (57,5%)	80
BARREIRA	0 (0%)	1 (2,5%)	9 (11,0%)	10
OUTROS	1 (10,0%)	11 (30,0%)	25 (31,5%)	37
TOTAL (n)	10 100%	37 100,0%	80 100,0%	127 100,0%

P=NS

Idade Do Primeiro Coito

A maioria das mulheres, 85 casos (67%) da amostra foi representada pelas que referiram o início da atividade sexual entre 10 e 19 anos.

Entre as mulheres com início precoce da atividade sexual, 51 entre 85 apresentaram associação dos tipos virais (A1,B1), assim como entre as que iniciaram atividade sexual após os 20 anos, 29 entre 42 apresentaram aquela associação.

Não houve diferença entre os grupos em relação à idade do início da atividade sexual (Tabela 7).

Tabela 7 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DO TIPO VIRAL DE HPV NÃO ONCOGÊNICO, ONCOGÊNICO E ASSOCIAÇÃO NÃO ONCOGÊNICO E ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO À IDADE DO PRIMEIRO COITO

IDADE/ANOS	TIPO VIRAL			TOTAL (n)
	A1 B0	A0 B1	A1 B1	
10 – 19	8 (80,0%)	26 (70,0%)	51 (64,0%)	85
20 – 32	2 (20,0%)	11 (30,0%)	29 (36,0%)	42
TOTAL (n)	10 100,0%	37 100,0%	80 100,0%	127 100,0%

P =NS

5.3 TIPO E MÉDIA DA QUANTIDADE VIRAL OBSERVADA NA AMOSTRA

As 130 amostras coletadas, para serem analisadas foram divididas em quatro grupos, quanto à presença e a quantidade do vírus: (A0, B0) – Negativo para ambos os

vírus, (A₁, B₀) – Positivo para o vírus A, (A₀, B₁) – Positivo para o vírus B, e (A₁, B₁) - Positivo para ambos os vírus.

A média da quantidade de vírus do tipo A (A₁, B₀) foi de 11,323 quando associado com vírus do tipo B (A₁, B₁), foi de 205,340.

Quando se evidenciou a presença do vírus do tipo B (A₀, B₁) na amostra, a média da quantidade viral foi de 419,395 e quando associada com vírus tipo A (A₁, B₁) esta média resultou em 423,656 (Tabela 8).

Tabela 8 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO RELATIVO À CARGA VIRAL DOS TIPOS NÃO ONCOGÊNICOS E ONCOGÊNICOS DOS QUATRO GRUPOS CONSIDERADOS

GRUPOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
A ₀ B ₀	0,3033	0,1069	0,6533	0,1266
A ₀ B ₁	0,4246	0,2243	419,3954*	602,2567
A ₁ , B ₀	11,323*	9,6097	0,424	0,3159
A ₁ , B ₁	205,3405*	390,7327	423,6566*	535,3813
* Médias consideradas positivas				P<0,05

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS TIPOS VIRAIS E O ÍNDICE DE GRAVIDADE COLPOSCÓPICO SIMPLIFICADO (ÍNDICE DE GRAVIDADE)

Nas 130 avaliações colposcópicas realizadas, foi criado índice colposcópico baseado na gravidade colposcópica da lesão. Este índice foi chamado de índice de gravidade colposcópico simplificado. Para tratamento estatístico dos dados, a avaliação

colposcópica com peso 4 foi agrupada com o peso 5, pois somente tivemos dois casos de avaliação colposcópica com valor 4.

A amostra da avaliação colposcópica foi representada por 23 casos (18%) onde não foi identificada lesão colposcópica (Índice 1), 83 casos (64%) que apresentaram alterações menores dentro e fora da zona de transformação (Índice 2 e 3), entre as quais tivemos 1 caso de discordância entre a colposcopia e a hibridização ou seja, a presença de alterações menores fora da zona de transformação, sendo negativa tanto para vírus do tipo não oncogênico como oncogênico (Ao, Bo). Os índices 4 e 5 foram representadas por 24 casos (18%).

Nos índices 3, 4, 5 não encontramos caso do tipo não oncogênico. Todos eram oncogênico ou associação não oncogênico/oncogênico (Gráfico 1).

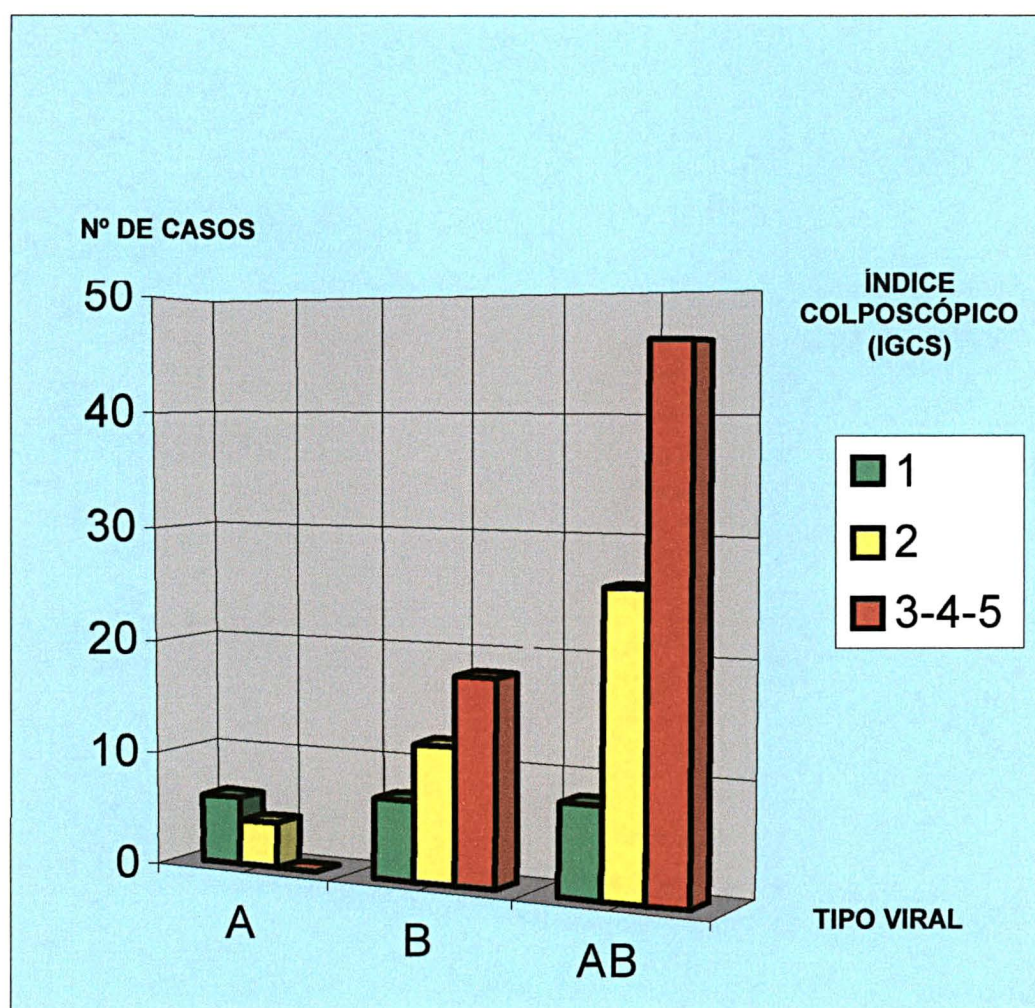
Houve diferença entre os grupos sendo maior o índice colposcópico entre mulheres que apresentaram a associação viral não oncogênico/oncogênico, e baixo índice colposcópico entre as que apresentaram vírus do tipo não oncogênico (Tabela 9).

Tabela 9 – NÚMERO DE CASOS COM O RESPECTIVO ÍNDICE COLPOSCÓPICO DOS TIPOS VIRAIS

ÍNDICE COLPOSCÓPICO	TIPO VIRAL				TOTAL (n)
	A1 B0	A0 B1	A1 B1	A0 B0	
1	6	7	8	2	23
2	4	12	26	1	43
3	0	13	27	0	40
4-5	0	5	19	0	24
TOTAL (n)	10	37	80	3	130

P <0,05

Gráfico 1 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA ENTRE O NÚMERO DE CASOS DE DETERMINADO TIPO VIRAL E O ÍNDICE DE GRAVIDADE COLPOSCÓPICO EM 130 MULHERES COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS DE BAIXO GRAU



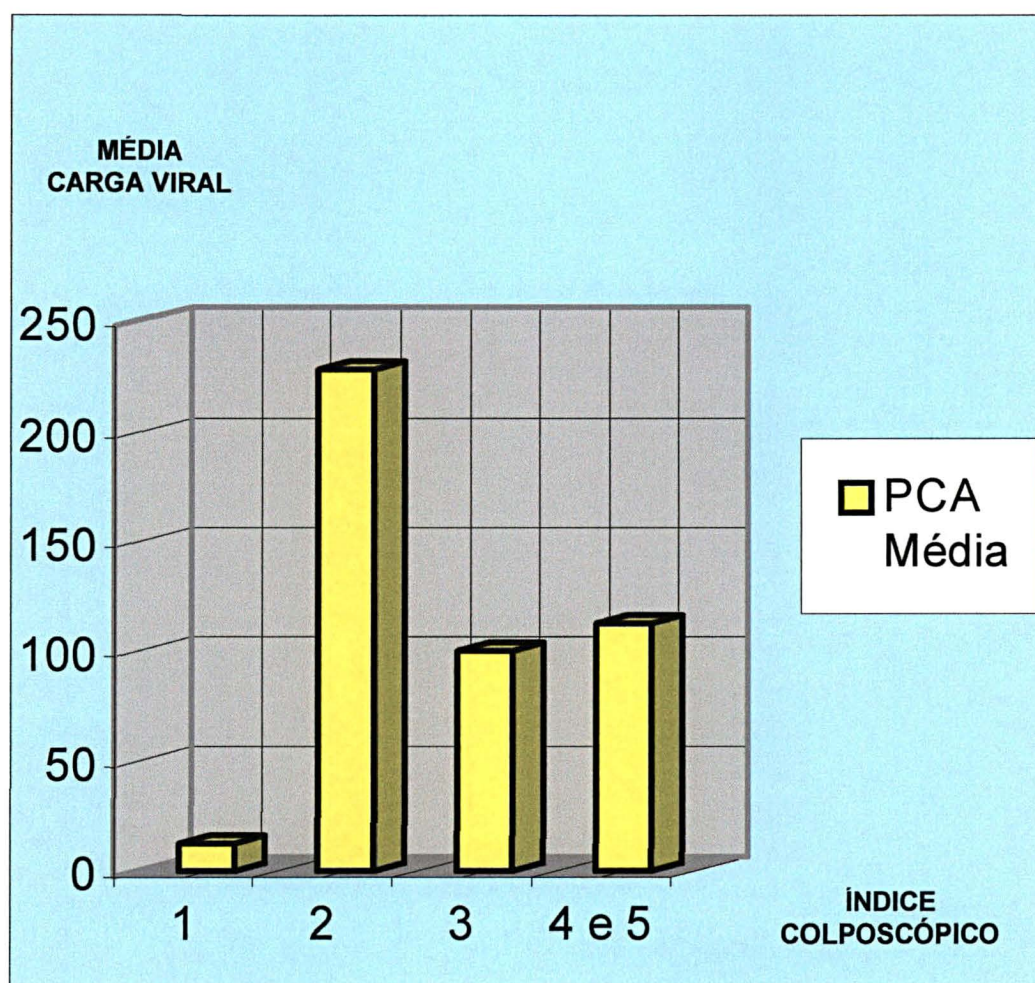
A maior média da carga viral para vírus tipo (A1 B0) não oncogênico (PCA) se deu com o índice colposcópico 2, ou seja, em alterações menores colposcópicas fora da zona de transformação. Não foi observado aumento da média da quantidade viral com o aumento do índice colposcópico (Tabela 10 e Gráfico 2).

Tabela 10 – NÚMERO DE CASOS COM AS RESPECTIVAS MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DA CARGA VIRAL (CV) DE VÍRUS DO TIPO NÃO ONCOGÊNICO EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES ÍNDICES COLPOSCÓPICOS

ÍNDICE COLPOSCÓPICO	Nº DE CASOS	MÉDIA DA CV	DESVIO PADRÃO
1	23	12,81	32,46
2	43	227,75	462,48
3	40	99,53	233,11
4 – 5	24	112,50	269,30

P = NS

Gráfico 2 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA RELAÇÃO ENTRE A MÉDIA DA CARGA VIRAL NÃO ONCOGÊNICA E O ÍNDICE DE GRAVIDADE COLPOSCÓPICO EM 130 MULHERES COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS DE BAIXO GRAU



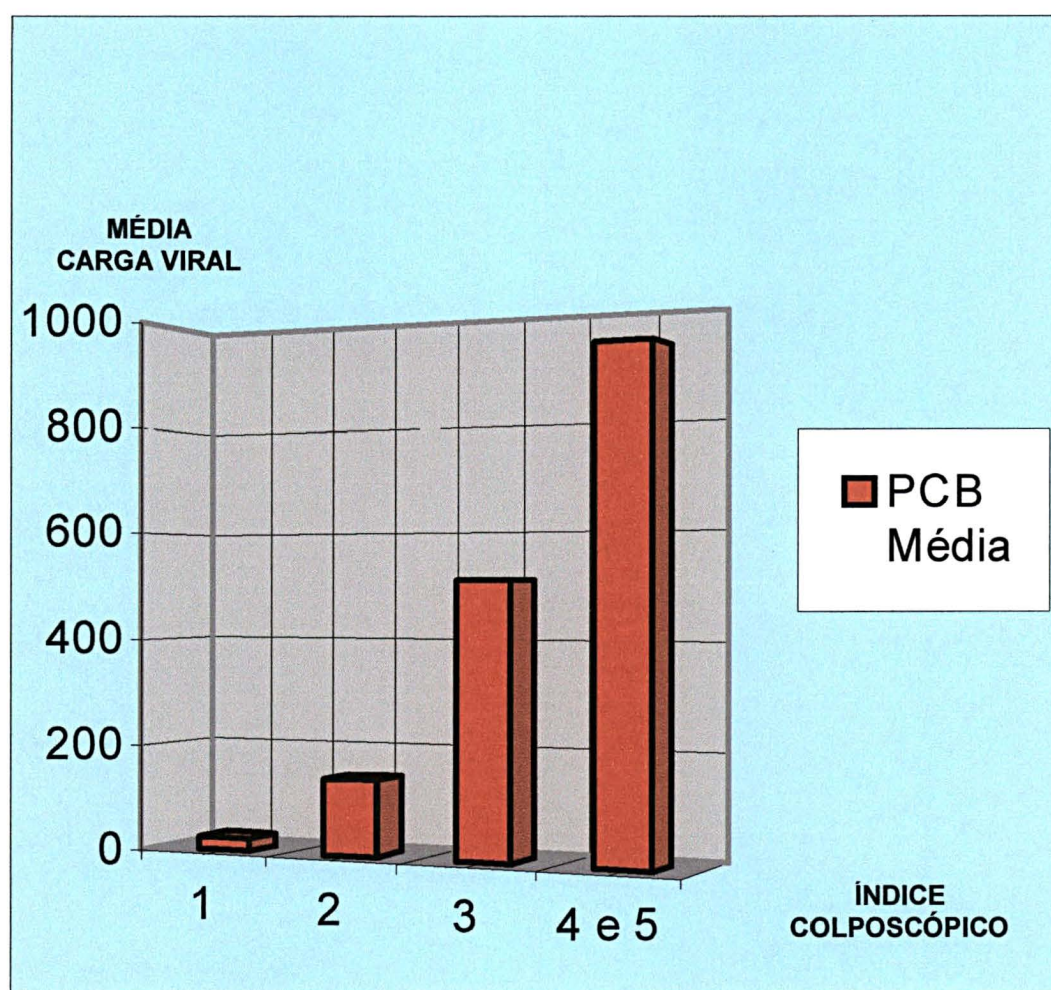
Houve uma relação direta do índice de gravidade e a média da carga viral do vírus tipo B - tipo oncogênico (PCB), ou seja, quanto maior o índice de gravidade, maior a média da carga viral. Obtivemos, portanto, maior média da carga viral em mulheres que apresentaram alterações maiores colposcópicas dentro e fora da zona de transformação (Índice 4 e 5) (Tabela 11 e Gráficos 3 e 4).

Tabela 11 – NÚMERO DE CASOS COM AS RESPECTIVAS MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DA CARGA VIRAL (CV) DE VÍRUS DO TIPO ONCOGÊNICO PARA OS DIFERENTES ÍNDICES COLPOSCÓPICOS

ÍNDICE COLPOSCÓPICO	Nº DE CASOS	MÉDIA DA CV	DESVIO PADRÃO
1	23	22,67	62,13
2	43	142,10	281,16
3	40	510,13	565,90
4 – 5	24	932,14	608,55

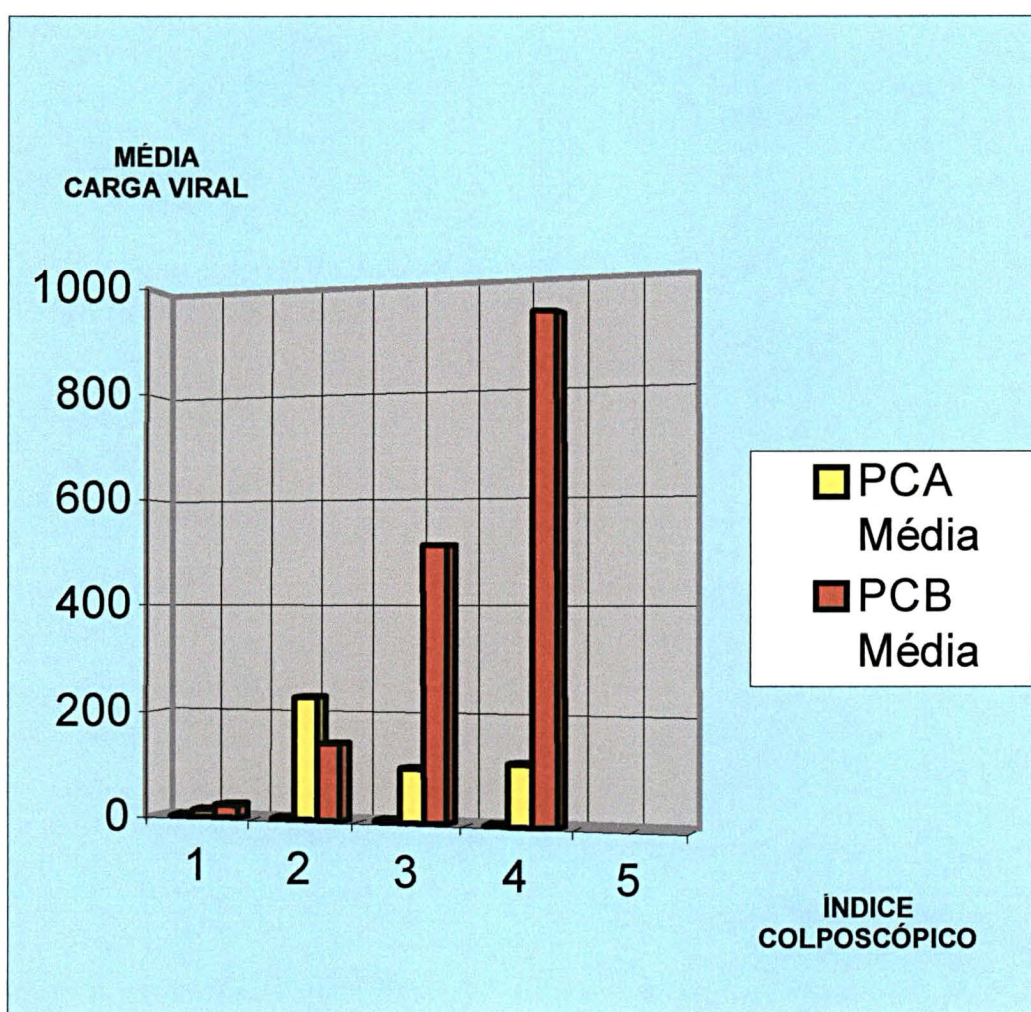
P <0,05

Gráfico 3 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA RELAÇÃO ENTRE A MÉDIA DA CARGA VIRAL ONCOGÊNICA E O ÍNDICE DE GRAVIDADE COLPOSCÓPICO EM 130 MULHERES COM ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS DE BAIXO GRAU



Na seqüência apresentamos a representação gráfica da relação entre a média da carga viral não oncogênica e oncogênica e o IGCS (Gráfico 4).

Gráfico 4 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS CARGAS VIRAIS NÃO ONCOGÊNICAS E ONCOGÊNICAS PARA OS DIFERENTES ÍNDICES DE GRAVIDADE COLPOSCÓPICA



5.5 ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS ÍNDICES COLPOSCÓPICOS RELATIVOS AOS TIPOS VIRAIS ENCONTRADOS NA AMOSTRA

O teste estatístico Anova (análise de variância) aplicado aos índices colposcópicos, nos mostrou uma diferença significativa entre os grupos, ou seja, eram estatisticamente diferentes.

Com o propósito de localizar essa diferença, foi desdobrado o efeito do grupo em: portadores do vírus tipo A (A1 B0) e não portadores desse tipo; portadores do vírus tipo B (A0 B1) e não portadores dele; e, finalmente, a interação dos dois tipos virais, uma vez que se pretendia verificar se o comportamento do vírus tipo B (A0 B1) oncogênico sofria alguma alteração na presença do vírus tipo A (A1 B0), não oncogênico.

Observamos somente diferença significativa entre os grupos portadores ou não do vírus do tipo B (tipo oncogênico). Os demais grupamentos não apresentaram nenhuma diferença significativa nos mostrando um comportamento independente do vírus do tipo oncogênico. Isto significa que a presença do vírus oncogênico independe se está ou não associado a outro tipo viral (Tabela 12).

Tabela 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS ÍNDICES COLPOSCÓPICOS RELATIVOS AOS QUATRO GRUPOS CLASSIFICADOS DE ACORDO COM OS TIPOS DE VÍRUS ENCONTRADOS NA AMOSTRA

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
GRUPOS	3	2,3814	0,3978	7,22
A1 B0	1	0,1737	0,1773	1,61
A0 B1	1	2,1260	2,1260	19,34
A1 B0 X A0 B1	1	0,0781	0,0781	0,71
RESÍDUO	126	13,8421	0,1099	
TOTAL	129	16,2235		

P<0,05

C.V. = 18,99%

6 DISCUSSÃO

O câncer cérvico uterino constitui um dos grandes e importantes problemas de saúde pública, ocupando o 2º lugar entre os cânceres no mundo, estando atrás apenas da ocorrência do câncer da mama.

No mundo, ocorrem cerca de 500.000 novos casos de câncer cervical por ano, sendo que 80% deles são observados em países em desenvolvimento.

Atualmente existem amplas evidências da implicação da infecção viral pelo HPV, fundamentalmente os HPV do tipo oncogênico, como um dos fatores causais no desenvolvimento das neoplasias intra-epiteliais cervicais e do carcinoma invasor. Em contraste, outros tipos de HPV, referidos como HPV não oncogênicos ou de baixo risco, estão associados com o desenvolvimento de condilomas acuminados e outras manifestações da infecção viral sendo que raramente, ou nunca, progridem para carcinoma cervical.

É importante ressaltar que o HPV não constitui uma causa suficiente para o desenvolvimento da doença neoplásica mas, são necessárias associações a certos co-fatores para que um percentual das infecções persistentes possa vir em algum momento progredir e dar lugar ao câncer cervical (ZÜR HAUSEN, 1988).

Entre os achados deste trabalho, ressalta-se uma alta prevalência de vírus oncogênico (28,5%) e a associação não oncogênica/oncogênica (61,5%), em mulheres com citologia oncológica de baixo grau. Tais dados mostram-se compatíveis com a literatura, pois a prevalência do DNA do HPV poderá variar de 1% a 100%, de acordo

com a sensibilidade do método utilizado e com o perfil de risco do grupo estudado (GUERRERO et. al. (1992).

Para a definição da presença do DNA do HPV, utilizamos a metodologia de biologia molecular da Captura Híbrida. Em relação a sua sensibilidade, comparada aos demais métodos, é considerada de excelência; como poderemos observar na tabela abaixo (Tabela 13).

Tabela 13 – COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS MÉTODOS UTILIZADOS NA DETECÇÃO DO DNA-HPV

Método	Sensibilidade	Especificidade	Padrão de Comparação	Limite
PCR	0,90 – 1,0	Excelente/Híbrid.	Histologia	< 10 –100
C.H.	0,74 – 0,93	0,61 – 0,71	Histologia	5 X 10 ³
S.B.	0,35 (b)	0,94 (b)	PCR	0,01 – 0,1/cel.
D.B.	0,39 – 0,54	0,94	PCR	1 – 10/cel.
I.S.H.	≤ 0,45 (a)	_____	Histologia	20 –25/cel.

Fonte: Intervirology 39, p. 145-157, 1996.

NOTAS: PCR = Reação em cadeia da Polimerase, CH= Captura Híbrida, SB= Southern Blot, Db= Dot Blot, I.S.H= Hibridização in situ.

Como observamos, os vários métodos propostos na detecção do DNA-HPV diferem em suas sensibilidade, especificidade e praticidade.

Utilizamos o teste de captura híbrida em nosso estudo por tratar-se de um método de amplificação do sinal e não da amostra, de fundamentada utilidade, principalmente pelo seu caráter prático e de fácil realização, com alta sensibilidade e especificidade (LÖRINCZ, 1996b; CLAVEL et al., 1998). Além de tratar-se de metodologia de caráter qualitativo, com possibilidade de definir o grupamento viral (de alto ou baixo risco), apresenta a vantagem de aferir a quantidade do vírus detectado. Em nosso estudo, essa metodologia mostrou-se com uma alta sensibilidade, pois em somente três casos não evidenciou a presença do DNA do HPV, embora não tenha sido comparada com a citologia oncótica, pois essa foi utilizada apenas como critério de inclusão. Os resultados obtidos estão de acordo com os dados da literatura.

A Hibridização “in situ” é a única técnica que permite a localização do DNA ou RNA do HPV em célula específica ou regiões teciduais, podendo ser sugerida a sua utilização na presença de lesões limítrofes.

A técnica de Dot Blot passou ao desuso pela sua baixa sensibilidade. O Southern Blot ainda é considerado por muitos como “padrão ouro” na detecção do DNA-HPV, embora recentemente tenha sido superado pelo PCR devido à sua alta sensibilidade e especificidade (ZAHM; NINDL; SCHNEIDER, 1999).

CLAVEL et. al. (1998) em ensaio clínico controlado comparando a sensibilidade da Captura Híbrida em Micro-placa com PCR, observaram uma sensibilidade semelhante de 95% e uma especificidade em torno de 67%. Concluem que o teste de Captura Híbrida é um teste tão sensível quanto o PCR, porém mais fácil de se utilizar na rotina clínica.

Na tabela abaixo podemos observar os vários resultados obtidos na avaliação da sensibilidade do método da Captura Híbrida comparando-os com a citologia oncológica (Tabela 14).

Tabela 14 – ANÁLISE COMPARATIVA DA SENSIBILIDADE DA METODOLOGIA DE CAPTURA HÍBRIDA EM RELAÇÃO À CITOLOGIA ONCOLÓGICA NA DETECÇÃO DO HPV, SEGUNDO VÁRIOS AUTORES

AUTORES	PAÍS	SENSIBILIDADE	
		DNA /HPV	CITOLOGIA
WALBOOMERS et al. (1999)	Holanda	100%	86%
BIREMBAUT et al. (1999)	França	97%	75%
CUZICK et al. (2000)	Inglaterra	95%	75%
SCHIFFMAN (2000)	Costa Rica	89%	77%
HILL et al. (1999)	Africa do Sul	86%	78%
RATNAM et al. (1999)	Canadá	86%	37%
SHAH (1999)	Zimbabue	81%	44%

Fonte: DORES; TAROMARU; GALLO, 1999.

Em relação à prevalência viral, encontramos a associação dos dois tipos virais (não oncogênico/oncogênico) como sendo a mais observada. Enquanto em 60%

encontramos associação viral, somente em 40% dos casos apresentaram apenas um tipo viral, quer não oncogênico como oncogênico.

Esses resultados diferem dos apresentados por HILDESHEIM et al. (1994) que concluíram ser a infecção viral do epitélio cervical, na maioria das vezes, causada pelo mesmo tipo viral. Assim como os resultados de BURK et al. (1996), que ao estudarem a prevalência do HPV em relação a idade observaram que apenas 9% das mulheres apresentavam múltiplos tipos virais. Devemos porém ressaltar que a amostra da pesquisa de BURK et al. (1996) não era representada por mulheres que apresentavam lesão de baixo grau citológico, mas por aquelas que não sabiam o seu status citológico.

FAIT et al. (1998) ao avaliarem mulheres com lesões de baixo grau citológico de repetição, com colposcopias normais, seguido de hibridização molecular de HPV por captura híbrida, biópsia e estudo histológico, observaram que entre as que confirmaram lesões de baixo grau no estudo histológico, 20% apresentaram vírus do tipo oncogênico. Entre as de alto grau, 95% apresentaram vírus do tipo oncogênico. Estes resultados encontrados por FAIT et al. (1998), diferem em partes do presente estudo, pois sua amostra foi representada por mulheres com colposcopias normais.

ADAM et al. (2000), ao avaliarem onde as características de fatores demográficos e comportamentais influenciariam na identificação de doenças cervicais, concluem que a prevalência da detecção do DNA do HPV entre mulheres portadoras de lesões cervicais, de baixo como de alto grau são similares, porém dependentes da idade. Concluíram também que a prevalência do HPV foi significativamente maior entre mulheres que não apresentavam evidências de neoplasia intra-epiteliais.

Nossos resultados são semelhantes aos obtidos por SUN et al. (1995) que encontraram 42% de HPV oncogênico entre mulheres com citologias normais, 80% nas que apresentavam lesões de baixo grau, e 79% entre as de alto grau.

HALL et al. (1996), ao correlacionarem o DNA do HPV determinado por Captura Híbrida com o diagnóstico citológico e histológico de 151 mulheres que apresentavam alterações citológicas, observaram que 92% das mulheres HPV positivas apresentavam vírus do tipo oncogênico, sendo que 77% apresentavam somente vírus do tipo oncogênico e 15% a associação não oncogênica/oncogênica. Assim como os resultados obtidos por ROTELI et al. (1997) que ao avaliarem a associação dos vários tipos de HPV e outras infecções vaginais com lesões cervicais, observaram uma alta prevalência de vírus do tipo oncogênico entre o grupo de mulheres com citologias negativas, e também entre as que apresentavam lesões de baixo grau. Entretanto, a taxa de detecção de DNA de HPV foi maior em lesões de maior gravidade. Estes resultados foram corroborados por CLAVEL et al. (1999) que, ao estudarem a utilização da Captura Híbrida como método de rotina na detecção de lesões de alto grau, encontraram entre mulheres com lesões de baixo grau 76,8% de vírus do tipo oncogênico ou a associação não oncogênica/oncogênica, e somente 7,1% de vírus do tipo não oncogênico.

Resultados semelhantes também já foram referidos por LÖRINCZ et al. (1987) que observaram que certos tipos virais estavam envolvidos no desenvolvimento de lesões cervicais, e que os tipos oncogênicos apresentavam uma taxa de detecção de DNA de HPV tanto maior, quanto maior a gravidade da lesão.

HERRERO et al. (2000), ao avaliarem a prevalência da infecção pelo HPV tipo específico em base populacional em área rural da Costa Rica observaram um pico da prevalência da infecção viral aos 25 anos, e outro, após os 55 anos, entre mulheres com citologias normais, apesar de tais citologias estarem predominantemente associadas a tipos virais não oncogênicos. Entre as mulheres que apresentavam lesões de baixo grau, 73% eram positivas para vírus do tipo oncogênico e a prevalência decrescia com a idade. Entre mulheres que apresentavam lesões de alto grau, 89% eram positivas para tipos oncogênicos.

Na tabela abaixo podemos comparar os resultados obtidos por vários autores quanto à prevalência do tipo viral oncogênico em lesões de baixo grau (Tabela 15).

TABELA 15- ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS DA PREVALÊNCIA DE HPV ONCOGÊNICO EM LESÕES CITOLÓGICAS DE BAIXO GRAU, SEGUNDO VÁRIOS AUTORES

AUTOR	MÉTODO	VÍRUS ONCOGÊNICO
SUN et al. (1995)	CH	80%
ROTELI et al. (1997)	CH	93%
HERRERO et al. (2000)	PCR	73%
CURCIO et al. (2000)	CH	90%

Nota: CH: Captura Híbrida

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Ao compararmos os tipos virais encontrados na amostra com as variáveis epidemiológicas observamos, em relação à idade, que entre as mulheres com até 29

anos, 60 casos (88%) apresentaram vírus oncogênico ou a associação não oncogênico /oncogênico. Nas acima de 30 anos, 57 entre 59 (96%) apresentaram essa associação. Entretanto, a oncogenicidade do vírus não mostrou relação estatística quando analisada quanto à idade das mulheres.

Comparando com os resultados apresentados por BURK et al. (1996), que observaram um declínio da prevalência da infecção do HPV em mulheres com mais idade, quando comparadas com mulheres mais jovens, observamos resultados discordantes. Este fato parece ser independente do comportamento sexual, sugerindo um efeito protetor biológico de imunidade ao HPV por exposições múltiplas anteriores. Tendo, portanto, uma relação inversa entre a idade e o achado de DNA de HPV quer do tipo não oncogênico como oncogênico.

HERRERO et al. (2000), observaram um declínio da prevalência de lesões de baixo grau com a idade, porém um aumento da prevalência na identificação de vírus do tipo oncogênico. Observaram ainda um primeiro pico na prevalência de lesões de alto grau ao redor dos trinta anos, e outro, após os 65 anos. Sendo que entre mulheres que apresentavam lesões de baixo grau 73% apresentavam vírus do tipo oncogênico.

Em relação à paridade não encontramos diferenças quando comparamos os grupos portadores de vírus do tipo não oncogênico e oncogênico. Entretanto podemos observar que os dados concordaram com os de BECKER et al. (1994), e de OLSEN; GJOEN; SAUER, (1995), que não encontraram relações consistentes entre a paridade e o tipo viral.

Em relação ao número de parceiros sexuais, o achado de uma alta prevalência da associação viral não oncogênica/oncogênica embora sem significado estatístico,

quando comparamos o grupo de mulheres com parceiro único com o grupo de mulheres com dois ou mais parceiros sexuais, pode ser explicado pela amostra pois, 82 casos (64%) foi representado por mulheres com dois ou mais parceiros. Este resultado pode explicar o fato de que epidemiologicamente o carcinoma do colo uterino e suas lesões precursoras não apresentam diferenças entre o grupo de mulheres com parceiro único ou múltiplos.

No caso de parceiro único, mas com antecedente de múltiplos parceiros sexuais, pode ele transferir para sua parceira sexual vários tipos virais com diferentes níveis de carga viral adquirida em experiências sexuais anteriores. Embora alguns trabalhos tenham mostrado uma diferença entre os grupos de mulheres com parceiro único e parceiros múltiplos, isto só acontece quando se compara parceiro único com cinco ou mais parceiros, podendo o risco de desenvolvimento de câncer cervical aumentar em até 3 vezes (MARTIN, 1967; ROTKIN, 1967; TERRIS et al., 1967).

Os resultados obtidos na análise da variável epidemiológica hábito de fumar, mostraram uma tendência das mulheres fumantes apresentarem vírus oncogênico, embora destituído de significância estatística para essa amostra. Entre 18 de 53 (34%) casos, apresentavam vírus do tipo oncogênico, e 31 entre 53 (58%), apresentavam a associação viral não oncogênica/oncogênica. Estes resultados concordam com os dados apresentados por HILDESHEIM et al. (1993), que encontraram uma forte associação entre o fumo e os tipos virais oncogênicos, podendo essa associação facilitar o aumento do risco de desenvolvimento de lesões cervicais.

Esses dados são corroborados pelos achados de ROTELI et al. (1998), que ao avaliarem o fumo como fator de risco para o desenvolvimento de lesões de alto grau

concluem que a severidade da neoplasia intra-epitelial cervical está claramente relacionada com dois fatores de risco, a presença de vírus do tipo oncogênico e o hábito de fumar. Nesse estudo, o HPV tipo oncogênico foi indentificado em um percentual significativamente maior entre mulheres fumantes.

Embora não tenhamos avaliado a quantidade de cigarros consumidos e o tempo de uso, nossa amostra foi representada em mais de 58% por mulheres não fumantes.

WILKENSTEIN (1990), refere existir uma relação dose resposta entre a duração, a intensidade e o risco de neoplasias cervicais. Agentes carcinogênicos contidos no cigarro podem estar envolvidos na história natural das neoplasias intra-epiteliais. Tais agentes podem ser responsáveis por alterações genômicas da célula hospedeira e induzirem à tumorigênese, principalmente entre grupo de mulheres portadoras de vírus do tipo oncogênico. Este achado foi corroborado por HOLLY et al. (1986) que encontrou altas concentrações de nicotina e N-nitrosamina, considerados agentes mutagênicos, no muco cervical de mulheres fumantes portadoras de vírus oncogênico.

PROKOPCYZYK et al. (1997) também encontraram o aumento de alterações genômicas no DNA da célula hospedeira de fumantes portadoras de vírus do tipo oncogênico.

O efeito carcinogênico do tabaco é tipo específico, aumentando a incidência de lesões de alto grau, se elas estiverem associadas a tipos oncogênicos de HPV (KATAJA et al., 1990).

Os resultados obtidos na avaliação da utilização dos vários métodos anticoncepcionais nos mostraram uma amostra representada predominantemente por mulheres usuárias de anticoncepcionais orais hormonais, 80 casos (63%).

Embora não tenhamos avaliado o tempo de uso dos anticoncepcionais, não encontramos diferenças entre os grupos. Estes dados são corroborados com os achados de BOYCE et al. (1977) e CELENTANO et al. (1987), que não acharam relação entre usuárias e não usuárias de anticoncepcionais e os tipos virais. Outras citações da literatura como as de SYRJANEN et al. (1984), e PARRAZINI et al. (1992) além de não observarem a diminuição da transmissibilidade da infecção do HPV, não encontraram diminuição do risco de desenvolvimento de lesões pré-invasivas, uma vez que a transmissibilidade se faz por contato direto via solução de continuidade epitelial. Por outro lado, VESSEY et al. (1983) e CLARKE et al. (1985), encontraram aumento do risco de desenvolvimento de lesões pré-invasivas entre mulheres usuárias de anovulatórios orais, pois elas se expuseram a maior número de contatos sexuais.

Outros relatos da literatura referem uma relação positiva entre mulheres usuárias de anovulatórios hormonais, citando o tempo de uso como a principal variável epidemiológica, que poderia interferir no risco de desenvolvimento de lesões cervicais, quer não invasivas como invasivas (BRINTON, 1991). A maioria das citações apresentam, em comum, a dificuldade de estabelecer o ponto no qual o potencial de influência do uso de anticoncepcional hormonal iria agir sobre a história natural da doença.

Em relação a utilização dos métodos de barreiras, quer masculino como feminino, observamos uma baixa representatividade deles na amostra, pois só tivemos 10 casos (8%), sendo que, entre eles, nenhum apresentou vírus do tipo não oncogênico. Nos demais casos apresentaram vírus oncogênico ou a associação não oncogênica/oncogênica.

Embora a limitação no número de casos estudados não nos permita descartar a existência de uma associação, a quase totalidade das mulheres, (9 entre 10), apresentaram a associação não oncogênica/oncogênica. A literatura aponta um efeito protetor entre as usuárias de métodos de barreira, com a diminuição da transmissibilidade do HPV, quer do tipo não oncogênico como do tipo oncogênico. Conseqüentemente, haveria uma diminuição do risco de desenvolvimento de lesões precursoras e invasoras do colo uterino com o tempo de uso destes métodos (HARRIS; BRINTON; CANDELL, 1980; BRINTON, 1992; BECKER et al., 1994).

A variável idade do primeiro coito, demonstrou uma amostra representada por mulheres com início precoce da atividade sexual, pois 85 casos (67%) iniciaram a sua atividade sexual entre 10 e 19 anos. Não encontramos diferenças entre os grupos, embora tivéssemos observado, tanto no grupo de mulheres com início precoce, como nas acima de 20 anos, uma tendência a apresentarem vírus oncogênicos e a associação deles. Consonante com os resultados de BRINTON (1992), BECKER et al. (1994), OLSEN; GJOEN; SAUER (1995) que não encontraram relação consistente entre neoplasias cervicais e idade do primeiro coito.

Ao analisarmos o comportamento da média da quantidade viral entre as mulheres portadoras do vírus tipo oncogênico, observamos ser essa média distinta das do grupo tipo não oncogênico. Para melhor comparação, podemos visualizar esses dados na tabela abaixo (Tabela 16).

Tabela 16—COMPARAÇÃO DOS TIPOS VIRAIS COM AS RESPECTIVAS MÉDIAS DE CARGAS VIRAIS

TIPO VIRAL	MÉDIA DE CARGA VIRAL
NÃO ONCOGENICA (A1 B0)	11,323
ONCOGÊNICA (A0 B1)	419,395
NÃO ONCOG./ONCOG (A1 B1)	423,656
Extraída da Tabela 8	P< 0,05

A média da quantidade viral encontrada na amostra foi de 11,323 entre as mulheres portadoras de vírus do tipo não oncogênico (A1 B0); e quando essa média se associa a de vírus oncogênico (A0 B1), resultou em uma média de carga viral de 205,340. Ao observarmos a média da quantidade viral oncogênica (A0 B1), essa foi mais que o dobro do que as do vírus do tipo não oncogênico (A1 B0) (419,395), havendo um aumento quando se associava a vírus do tipo não oncogênico (A1 B0) (423,656). Esse comportamento da média da carga viral oncogênica talvez represente o potencial patogênico do vírus sobre o epitélio cervical, que poderá ou não desenvolver lesões dependendo do estado imunológico das portadoras além de outros fatores. Conforme citado por SYRJÄNEN et al. (1988) e MATSUURA et al. (1998), que referem lesões intra-epiteliais cervicais associadas com HPV de alto risco (tipo oncogênico) estão freqüentemente associadas com lesões cervicais progressivas.

Tais resultados concordam com os apresentados por SWAN et al. (1999) que, ao estudarem a associação entre os tipos de HPV e suas cargas virais com as patologias cervicais, observaram que a média da carga viral dos vírus oncogênicos, principalmente do tipo 16, tinha um aumento acentuado com o aumento da gravidade da lesão. Essa

carga viral variou de $2,2 \times 10^7$ em mulheres com citologias normais para $4,1 \times 10^7$ em mulheres com lesões de baixo grau, podendo chegar até $1,3 \times 10^9$ cópias / μ g no carcinoma “in situ”.

Para avaliar o dano tecidual decorrente da ação viral, criamos um índice colposcópico que chamamos de Índice de Gravidade Colposcópica Simplificado (IGCS), com a finalidade de localizar e quantificar aquelas lesões.

Em colposcopia, existem dois problemas a ser resolvidos, a terminologia ou nomenclatura e a classificação. Entende-se como terminologia, a tradução da imagem observada em um termo que apresentar uma correlação com os achados histológicos da lesão. A nomenclatura, como sendo um meio de comunicação que serve para definir conceitos e identificar tudo que é necessário, para um adequado entendimento e transmissão de pessoa a pessoa, de modo a não deixar dúvidas.

A matriz das terminologias utilizadas em todas as classificações é a terminologia alemã. Ela descreveu e codificou os vários aspectos colposcópicos, sendo que as demais modificaram termos ou interpretações e introduziram novos termos na tentativa de melhorar a capacidade interpretativa.

A Classificação Colposcópica Internacional (Roma), em vigor desde 1990, normatiza os achados colposcópicos em alterações maiores e menores, dentro e fora da zona de transformação, mas não os quantifica.

Por outro lado REID et al. (1984), e REID (1993), idealizaram e introduziram o índice colposcópico que leva seu nome e que tenta quantificar as lesões colposcópicas. Esse índice baseia-se na utilização da somatória de notas (score) atribuídas a cinco

variáveis encontradas nas lesões colposcópicas, quais sejam: a espessura da lesão, a reação ao ácido acético e ao iodo, as margens da lesão e a presença de atipia vascular. Tal classificação nos ajuda a reconhecer e distinguir as lesões de maior gravidade, podendo chegar até 96% de concordância diagnóstica com a histologia. No entanto, este índice não localiza os achados colposcópicos.

Ao adotarmos o Índice de Gravidade Colposcópico Simplificado nosso intuito foi o de localizar e quantificar os achados colposcópicos e, fundamentalmente, utilizá-lo para correlacionar com variáveis relacionadas ao HPV.

Nas 130 avaliações colposcópicas realizadas, em dois casos de lesões de baixo grau citológico não foi identificada alteração colposcópica e igualmente nenhum tipo viral. Isto talvez possa ser explicado pela subjetividade da interpretação citológica, onde o achado de citologias falso positivas pode variar de 1% a 6% (RIEGER; FONSECA, 1978).

No índice colposcópico 2, tivemos um caso de discordância entre a colposcopia e a hibridização, na qual a paciente apresentava alterações colposcópicas mas não foi identificada a presença viral.

Nos índices colposcópicos de maior gravidade (3,4,5) nenhuma mulher apresentou vírus do tipo não oncogênico, definindo a relação direta entre a gravidade da lesão colposcópica e a oncogenicidade do HPV.

Esses resultados são concordantes com os obtidos por MOSCICKI et al. (1993), que, ao compararem os achados colposcópicos entre mulheres jovens HPV positivas e negativas, encontraram maior gravidade dos índices colposcópicos entre mulheres portadoras de vírus do tipo oncogênico.

Quando comparamos os índices colposcópicos com as médias de carga viral do tipo não oncogênico, embora sem significância estatística, observamos que a maior média se deu com o índice colposcópico 2, ou seja, entre mulheres com alterações menores, fora da zona de transformação. Este resultado é compatível com os achados de SCHIFFMANN (1992a), onde a alta prevalência de HPV e dos danos teciduais seguem a curva epidemiológica, na qual há um rápido aumento após a exposição ao primeiro coito infectante.

Em relação à validade da utilização do índice colposcópico, a análise estatística nos mostrou uma diferença significativa entre os grupos. Como SIANTURI (1993), que, ao utilizar o Índice Colposcópico de Reid na avaliação de 115 mulheres com citologias alteradas demonstrou haver diferenças entre os grupos, ao comparar mulheres portadoras de NIC I com NIC II e III.

Quando da comparação dos índices colposcópicos com a média dos vírus tipo oncogênico, observamos uma significativa relação direta entre o índice colposcópico e a média da carga viral, havendo, portanto, maior achado de lesões de maior gravidade dentro da zona de transformação, quando apresentavam as maiores médias de cargas virais (IGCS 5). Dessa maneira pensamos que esse índice possa ser utilizado na prática, pois, correlacionou-se com a quantidade viral (CV) e com a oncogenicidade viral promovendo assim a sua validação.

Partindo do princípio de que, para o desenvolvimento de uma lesão intra-epitelial de alto grau, há necessidade do envolvimento efetivo de vírus do tipo oncogênico, restava-nos saber qual o comportamento desse vírus quando associado ao vírus tipo não oncogênico. Obtivemos significância estatística somente no grupo de mulheres

portadoras do vírus tipo oncogênico, mostrando-nos um comportamento independente deste estar ou não associado com o vírus não oncogênico. Ou seja, a associação do vírus não oncogênico ao oncogênico não influenciou na oncogenicidade deste último.

Ressalte-se que essas mulheres estão sendo diagnosticadas numa fase em que a alteração celular encontra-se em estadio inicial de transformação intra-epitelial e poderá evoluir para lesão de maior gravidade (SUN et al., 1995).

O carcinoma cervical instala-se através do desenvolvimento das neoplasias intra-epiteliais cervicais, as quais dependem do grau de anormalidades induzidas pela ação viral sobre o epitélio cervical (KIVIAT, 1996).

Portanto, podemos referir que o fato de a paciente apresentar citologia oncótica de baixo grau não nos assegura que ela seja causada por vírus do tipo não oncogênico, e nem que este tipo de lesão tenha tendência à regressão.

O achado de uma alta prevalência de vírus tipo oncogênico com alta carga viral, tendo uma relação direta com os danos teciduais identificados pela colposcopia e quantificados pelo índice colposcópico nos alerta, no mínimo, da necessidade de um acompanhamento cuidadoso a longo prazo. Vários estudos prospectivos de acompanhamento das neoplasias intra-epiteliais cervicais associadas com o HPV indicam que a persistência de infecção por vírus de alto risco (tipos oncogênicos), com alta carga viral, está freqüentemente associada a doenças cervicais progressivas (SYRJÄNEN et al., 1988; KATAJA et al., 1990; KONNO; SATO; YAJIMA, 1992; HELLBERG et al., 1993; EBISAWA et al., 1994; IWASAKA et al., 1994; MATSUURA et al., 1998), os quais corroboram esse estudo.

7 CONCLUSÕES

- 1) A prevalência da positividade do HPV dos tipos não oncogênico, oncogênico e a associação desses foi de 7,5% (10 casos), 28,5% (37 casos), 61,5% (18 casos) respectivamente, analisados pelo método de captura híbrida em micro-placa em lesões de baixo grau.
- 2) Não houve associação dos tipos virais (não oncogênico, oncogênico e associação desses) com as variáveis epidemiológicas.
- 3) A média da quantidade viral (CV) dos tipos oncogênicos (CV = 419,395) e a associação desses (CV = 423,656) foi muito superior à média da quantidade não oncogênica (CV = 11,323).
- 4) Não houve relação entre os tipos virais não oncogênicos e o IGCS (Índice de Gravidade Colposcópica Simplificado), porém houve relação direta entre os vírus do tipo oncogênico e o índice colposcópico.
- 5) O comportamento do vírus oncogênico foi independente da associação aos vírus dos tipos não oncogênicos, não potencializando com agravamento das lesões colposcópicas.

ANEXOS

ANEXO 1 - PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS

Identificação

Nome: _____

Endereço: _____

Nº do prontuário: _____

Idade: 10 – 29 anos ☐ ≥ 30 anos ☐Paridade: 0 a 1 filho ☐ ≥ 2 filhos ☐Nº de Parceiros sexuais: 1 parceiro ☐ ≥ 2 parceiros ☐Tabagismo: Sim ☐ Não ☐**Métodos Anticoncepcionais:**Hormonais (pílula, injetáveis, implantes) ☐Barreira (preservativo masculino/feminino, diafragma) ☐Outros (laqueadura, DIU, natural, nenhum) ☐Idade do primeiro coito: 10 a 19 anos ☐ 20 a 32 anos ☐

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____, abaixo assinado declaro estar ciente que participarei de um grupo de estudo para investigação de uma infecção viral da qual sou portadora. Declaro ainda, que fui devidamente informada de todos os procedimentos técnicos a serem adotados. Autorizo a publicação dos dados obtidos desta pesquisa, desde que seja omitida a minha identificação.

Não receberei nenhuma compensação pela minha participação neste estudo.

Assinatura da paciente : _____

Nome da paciente: _____

Testemunhas: _____

Assinatura do médico: _____

Nome do médico: _____

Data ____/____/____

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 THE 1991 BETHESDA WORKSHOP REPORT. The Revised Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 36, n. 3, p.273, 1992.
- 2 ADAM, E. et al. Papillomavírus detection: demographic and behavioral characteristics influencing the identification of cervical disease. **Am.J. Obstet. Gynecol**, St. Louis, v. 182, n. 2, p. 257 – 264, 2000.
- 3 ALMEIDA, J. D.; ORIEL, J. D.; STANNARD, L. Characterisation of virus found in genital warts. **Microbios.**, Cambridge, v. 3, p.225, 1969.
- 4 AYALA, J. O. Citologia das displasias cervicais. In: AYALA, J. O.; ORTIZ, F. N. **Citopatologia ginecológica**. São Paulo : Artes Médicas, 1978. p.122-123.
- 5 BAJARDI, F. et al. Nouveaux resultats de la cytologie et la colposcopie systematiques dans le diagnostic précoce du cancer du col de l'uterus. **Gynecol. Pract.**, v. 5, p. 315, 1959.
- 6 BAR-AM, A. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and HPV DNA among male partners of Israeli women with genital premalignant and human papillomavirus lesions. **Isr. J. Med. Sci.**, Jerusalém, v. 31, n. 6, p. 349–352, June 1995.
- 7 BARNES, W. et al. Possible prognostic significance of human papillomaviruses types in cervical cancer. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 29, p. 267–273, 1988.
- 8 BARTON, S. E. et al. Possible cofactors in the etiology of cervical intraepithelial neoplasia. An immunopathologic study. **J. Reprod. Med.**, Chicago, v. 34, n. 9, p. 613–616, Sept. 1989.
- 9 BECKER ,T.M. et al. Contraceptive and reproductive risk factors to cervical dysplasia in Southwestern hispanic and no hispanic women. **Int. J. Epidemiol.**, London, v. 23, p. 913, 1994.
- 10 BEDELL, M. A. et al. Application of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. **J. Virol.**, Washington, v. 65, p. 2254–2260, 1991.
- 11 BERGERON, C. et al. Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia: great diversity and distinct distribution in low and grade lesion. **Am. J. Surg. Pathol.**, New York, v. 16, p.641-649, 1992.

- 12 BERUMEN, J. et al. Amplification of HPV types 16 and 18 in invasive cervical cancer. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 667– 678, June 1995.
- 13 BIBBO, M.; KEEBLER, C. M.; WIED, G. L. Prevalence and incidence rates of cervical atypia. **J. Reprod. Med.**, Chicago, v. 6, p. 79, 1971.
- 14 BIREMBAUT, T. Human papillomavirus detection by hybrid capture II assay is a sensitive test to detect in routine high grade cervical lesion: a preliminary study on 1284 cases. In: INTERNATIONAL PAPILLOMAVIRUS CONFERENCE (17. : 1999 : Charleston). **Abstracts**. Charleston, 1999. p. 170.
- 15 BOSCH, F. X. et al. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 52, n. 5, p. 750, Nov. 1992.
- 16 BOSCH, F, X. et al. Prevalence of HPV in cervical cancer: a worldwide perspective. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 87, n.11, p. 796 – 802, 1995.
- 17 BOYCE, J. G. et al. Oral Contraceptive and cervical carcinoma. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 128, p. 761,1977.
- 18 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2000**. Rio de Janeiro, 2000.
- 19 BRINTON, L. A. et al. Cigarette smoking and invasive cervical cancer. **JAMA**, Chicago, v. 255, n. 23, p. 3265–3269, June 1986.
- 20 BRINTON, L.A. et al. Sexual and reproductive risk factors for invasive squamous cell cervical cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 79, p . 23-29, 1987.
- 21 BRINTON, L.A. et al. The male factor in the etiology of cervical cancer among sexually monogamous woman. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 44, n. 2, p.199-203, Aug. 1989.
- 22 BRINTON, L. A. et al. Parity as a risk factor for cervical cancer. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v. 130, p . 486-496, 1989.
- 23 BRINTON, L. A. et al. Oral contraceptive use and risk of invasive cervical cancer. **Int. J. Epidemiol.**, London, v. 19, p. 4–11, 1990.
- 24 BRINTON, L. A. Oral contraceptives and cervical neoplasias. **Contraception**, New York, v. 43, n. 6, p. 581–595, 1991.

- 25 BRINTON, L. A. Epidemiology of cervical cancer. In: MUÑOZ, N. et al. **The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus**. Lyon, France : International Agency for Research on Cancer, 1992. p.3 – 23.
- 26 BRISSON, J. et al. Condyloma and intraepithelial neoplasia of the cervix uterine: a case control study. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v. 128, n. 2, p. 337-342, Aug. 1987.
- 27 BRISSON, J. et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low and high grade lesion. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v. 140, n. 8, p. 700–710, Oct. 1994.
- 28 BURGHARDT, E. A european proposal for colposcopic classification. **Cervix**, v. 7, p. 251-254, 1989.
- 29 BURGHARDT, E. Terminology colposcopic. In: _____. **Colposcopy cervical pathology: textbook and atlas**. New York : Thieme Medical, 1991. p. 134-137.
- 30 BURGHARDT, E. Historical survey. In: _____. **Colposcopy cervical pathology: textbook and atlas**. New York : Thieme Medical, 1991. p. 3-7.
- 31 BURK, R. D. et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. **Sex. Trasm. Dis.**, Philadelphia, v. 23, p. 333–341, 1996.
- 32 BURNETT, A. F. et al. Prognostic significance of polymerase chain reaction detected human papillomaviruses of tumors and lymphnodes in surgically treated stage I b cervical cancer. **Gynecol. Onc.**, New York, v. 47, p. 343–347, 1992.
- 33 CAMPION, M. J. et al. Progressive potencial of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic and virological study. **Lancet**, London, v. 2, n. 8501, p. 237–240, Aug. 1986.
- 34 CELENTANO, D. D. et al. The role of contraceptive use in cervical cancer. The Maryland cervical case control study. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v. 126, n.4, p. 592– 604, 1987.
- 35 CERQUEIRA, E. M. et al. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix: association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 42, n. 3, p. 639–649, 1998.
- 36 CHAPMAN, W. Human Papillomavirus infections and their relationship to pre invasive and invasive cancer of the lower female genital tract. In: WRIGHT, C.;

- LICKRISH, G.; SHIER, M. **Basic and Advanced Colposcopy**. 2. ed. Canadá : Biomedical Communications, 1995. p. 3–28.
- 37 CHOO, K. B.; PAN, C. C.; HAN, S.H. Integration of HPV 16 into cellular DNA of cervical carcinoma; preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/ E7 ORFs. **Virology**, New York, v. 161, p. 259–261, 1987.
 - 38 CHUA, K. L.; HJERPE, A. Persistence of HPV infections preceding cervical carcinoma. **Cancer**, New York, v. 77, n. 1, p.121–127, 1996.
 - 39 CLARKE, E. A. et al. Cervical dysplasia: association with sexual behavior smoking and oral contraceptive use? **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 151, n. 5, p. 612–616, Mar. 1985.
 - 40 CLAVEL, C. et al. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection: comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 51, n. 10, p.737–740, Oct. 1998.
 - 41 CLAVEL, C. et al. Hybrid Capture II – based Human Papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high grade cervical lesion: a preliminary study on 1518 women. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 80, p. 1306–1311, 1999.
 - 42 COGGIN, J. R.; ZÜR HAUSEN, H. Workshop on papillomaviruses and cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 39, p. 545, 1979.
 - 43 COOPER, K. et al. Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasias shown by non isotopic in situ hybridization. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 44, p. 990–996, 1991.
 - 44 COX, J. T. et al. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of indetermined significance. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 172, n. 3, p.946–954, Mar. 1995.
 - 45 CUZICK, Y. et al. Human papillomavirus type DNA in cervical smears as a predict of high grade cervical intraepithelial neoplasia. **Lancet**, London, v. 339, n. 8799, p. 959–960, Apr. 1992.
 - 46 CUZICK, Y. et al. HPV testing in primary screening of older women. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 81, n. 3, p. 554–558, 1999.
 - 47 CUZICK, Y. Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. **JAMA**, Chicago, v. 283, n. 1, p. 81–87, 2000.

- 48 DALING, J. R.;SHEMAN, K. J; WEISS, N.S. Risk factors for condyloma accuminatum in women. **Sex. Transm. Dis.**, Philadelphia, v. 13, p.16-18,1986.
- 49 DE VILLIERS, E. M. et al. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. **Lancet**, London, v. 26, p. 703-705, 1987.
- 50 DE VILLIERS, E. M. Heterogeneity of the human papillomavirus group. **J. Virol.**, Washington, v. 53, p. 4898–4903, 1989.
- 51 DE VILLIERS, E. M. et al. Human papillomavirus DNA in women without and with cytological abnormalities results of a 5 year follow up study. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 44, p. 33–39, 1992.
- 52 DE VILLIERS, E. M. et al. Cervical intraepithelial neoplasia and HPV infection. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, Padua, v. 2, p.179–181, 1997.
- 53 DORES, G. B.; TAROMARU, E. K.; GALLO, C. Aspectos atuais do rastreamento das lesões HPV induzidas e o câncer do colo uterino com métodos morfológicos e biomoleculares. **News Lab.**, São Paulo, v. 35, p.196–205, 1999.
- 54 DYSON, M. et al. The HPV 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, Washington, v. 243, p.934–937, 1989.
- 55 EBISAWA, K. et al. Retrospective analysis of relationship between progression and regression of dysplasia and existence of HPV DNA by in situ hybridization. **Acta. Obstet. Gynecol. Jpn.**, v. 46, p. 1041–1048, 1994.
- 56 ELUF NETO, J. et al. Human papillomavirus and invasive cervical cancer. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 69, p.114, 1994.
- 57 FAIRLEY, C. K. et al. The absence of genital human papillomavirus DNA in virginal women. **Int. J. STD AIDS**, London, v. 3, p.414– 417, 1992.
- 58 FAIT, G. et al. Does typing of human papillomavirus assist in the triage of women with repeated low grade, cervical cytologic abnormalities? **Gynecol. Oncol. Surv.**, v. 70, p.319–322,1998.
- 59 FARTHING, A. et al. Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 47, n. 7, p. 649 – 652, July 1994.
- 60 FERENCZY, A. External genital human papillomavirus infection. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, Philadelphia, v. 5 .p. 98-106,1995.

- 61 FISHER, M.; ROSENFELD, W. D.; BURK, R. D. Cervical human papillomavirus infection in suburban adolescents and young adults. **J. Pediatr.**, St. Louis, v. 119, n. 5, p.821 – 825, Nov. 1991.
- 62 FLANNELLY, G. et al. Management of woman with mild and moderate cervical dyskaryosis. **B. M. J.**, London, v. 308, p.1399–1403, 1994.
- 63 FRANCESCHI, S. et al. Genital warts and cervical neoplasia an epidemiological study. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 48, p. 621-628, 1983.
- 64 FRANCO, E .L. Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v. 13, n. 6, p.1195-1206, Nov./Dec. 1991.
- 65 FRANCO, E .L. et al. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 172, n. 3, p. 756-763, 1995.
- 66 FUCHS, G. P.; PFISTER, H. Molecular biology of HPV mechanisms of keratinocyte transformation. In: GROSS, G., VON KROGH, G. **Human Papillomavirus Infection in Dermato-venereology**. New York : CRC, 1996. p. 15-46.
- 67 GAARENSTROOM, K. et al. Human papillomavirus DNA genotypes: prognostic factors for progression of cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 4, p.73-78, 1994.
- 68 GISSMANN, L.; PFISTER, H; ZÜR HAUSEN, H. Papillomaviruses: characterisation of four different isolates. **Virology**, New York, v. 76, p. 569, 1977.
- 69 GRAHAM, S. et al. Genital Cancer in wives of penile cancer patients. **Cancer**, New York, v. 44, p.1870–1874, 1979.
- 70 GROSS, G.; VON KROGH, G. Introduction. In: _____. **Human papillomavirus infections in dermatovenereology**. New York : CRC, 1976. p. 1-3.
- 71 GUERRERO, E. et al. Comparison of virapap, Southern hybridization and polymerase chain reaction methods of human papillomavirus identification in a epidemiological investigation of cervical cancer. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, p. 2951–2959, 1992.
- 72 HALL, J. E.; WALTON, L. Dysplasia of the cervix: a prospective study of 206 cases. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 100, p. 662–671, 1968.

- 73 HALL, S. et al. Human papillomavirus DNA detection in cervical specimens by Hybrid Capture: correlation with cytologic and histologic diagnoses of squamous intraepithelial lesion of the cervix. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 62, n. 3, p.353-359, 1996.
- 74 HALPERT, R. et al. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 68, p. 251-258,1986.
- 75 HARRIS, R. M. C.; BRINTON, L. A.; CANDELL, H. Characteristics of human with dysplasia or carcinoma in situ of the cervix uteri. **Br. J. Cancer.**, Edinburgh, v. 42, p. 359, 1980.
- 76 HATCH, K. D.; SCHNEIDER, A.; ABDEL-NOUR, M. W. An evaluation of human papillomavirus testing for intermediate and high risk types as triage before colposcopy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 172, n. 4, pt. 1, p. 1150–1155, Apr. 1995.
- 77 HEINS Jr., H.C.; DENNIS, E.J ; PRATT–THOMAS, H.R. The possible role of smegma in carcinoma of the cervix. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 76, p. 726-735 ,1958.
- 78 HELLBERG, D. et al. Behavior of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associated with various human papillomavirus (HPV) types. **Arch. Gynecol. Obstet.**, Berlin, v. 252, p. 119-128, 1993.
- 79 HERRERO, R. et al. Population based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 92, n. 6, p. 464–474, Mar. 2000.
- 80 HERRINGTON, C. S. HPV and cervical neoplasia I: classification, virology, pathology and epidemiology. **J.Clin. Pathol.**, London, v. 47, n. 12, p. 1066–1072, Dec. 1994.
- 81 HERRINGTON, C. S. HPV and cervical neoplasia II: interaction of HPV with others factors. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 48, n. 1, p.1-6, Jan. 1995.
- 82 HERRINGTON, C. S. et al. HPV testing in patientes with low grade cervical cytological abnormalities: a follow up study. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 49, n. 6, p. 493–496, June 1996.
- 83 HILDESHEIM, A. et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low income women in Washington D.C. **Sex. Transm. Dis.**, Philadelphia, v. 20, p. 279–285, 1993.

- 84 HILDESHEIM, A. et al. Persistence of type specific human papillomavirus infection among cytologically normal women in Portland, Oregon. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 169, n. 2, p. 235–240, Feb. 1994.
- 85 HILL, R. et al. Use of HPV DNA testing for cervical cancer screening: results from the Khayelitska study, South Africa. In: INTERNACIONAL PAPILLOMAVIRUS CONFERENCE (17. : 1999 : Charleston). **Abstracts**. Charleston, 1999. p. 171.
- 86 HILL, R. et al. Use of HPV DNA testing for cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. **JAMA**, Chicago, v. 283, n. 1, p. 8793, 2000.
- 87 HO G. Y. F. et al. Persistent genital HPV infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 87, n.18, p. 1365–1371, 1995.
- 88 HO, G. Y. F. et al. HPV 16 and cigarette smoking as risk factors for high grade cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 78, n. 3, p. 281–285, Oct. 1998.
- 89 HOLLY, E. A. et al. Mutagenic mucus in the cervix of smokers. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 76, p. 983-986, 1986.
- 90 HOWLEY, P. M. Human papillomaviruses. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 315, n. 17, p. 1089, Oct. 1986.
- 91 HOWLEY, P. M. Role of human papillomaviruses in human cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 51, n. 18, suppl., p. 5019– 5022, Sept.1991.
- 92 IKENBERG, H. et al. Human papillomavirus DNA in cervical carcinoma: correlation with clinical data and influence on prognosis. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 59, n. 3, p. 322–326, Nov. 1994.
- 93 INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Working group on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Human papilloma viruses. **IARC Sci. Publ.**, Lyon, v. 126, 1995.
- 94 IWASAKA, T. et al. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in cervical intraepithelial neoplasia: prospective follow up study. **Cervix Lower Female Genital Tract**, v. 12, n. 1, p.55-60, 1994.
- 95 JONES, C. J. et al. Risk factors for in situ cervical cancer: results from a case control study. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 50, n. 12, p. 3657, June 1990.

- 96 KALANTARI, M. et al. Human papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade. **Human Pathol.**, Philadelphia, v. 28, n. 8, p. 899–904, Aug. 1997.
- 97 KATAJA, V. et al. Prospective follow up of genital HPV infections: Survival analysis of the HPV typing data. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 6, p. 9–14, 1990.
- 98 KELSEY, J. L.; HILDRETH, N. G. **Breast and gynecologic cancer epidemiology.** Boca Raton : CRC, 1983.
- 99 KING, L. A. et al. Prognostic significance of the presence of human papillomavirus DNA in patients with invasive carcinoma of the cervix. **Cancer**, New York, v. 63, n. 5, p. 897–900, Mar. 1989.
- 100 KIVIAT, N. Natural history of cervical neoplasia: overview and update. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 175, n. 4, pt. 2, p. 1099–1104, Oct. 1996.
- 101 KJAER, K. S. et al. Case control study of risk factors for cervical squamous cell neoplasia in Denmark III: role of oral contraceptive use. **Cancer Causes Control.**, Oxford, v. 4, p. 513–519, 1993.
- 102 KJAER, K. S. et al. Different risk factor patterns for high grade and low grade intraepithelial lesions of the cervix among HPV positive and HPV negative young women. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 76, n. 5, p. 613 – 619, May 1998.
- 103 KONNO, R.; SATO, S.; YAJIMA, A. Progression of squamous cell carcinoma of uterine cervix from cervical intraepithelial neoplasia infected with human papillomavirus: a retrospective follow up study by in situ hybridization and polymerase chain reaction. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, New York, v.11, p.105–112, 1992.
- 104 KOUTSKY, L. A.; GALLOWAY, D. A.; HOLMES, K. K. Epidemiology genital human papillomavirus infection. **Epidemiol Rev.**, Baltimore, v. 10, p. 122–163, 1988.
- 105 KOUTSKY, L. A. et al. A cohort study of the risk of CIN grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 327, n. 18, p.1272–1278, Oct. 1992.
- 106 KUHN, L. et al. Human Papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening. Resource settings. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 87, p. 818–825, 1995.
- 107 KURMAN, J. R., SOLOMON, D. **O Sistema Bethesda para o relato de diagnóstico citológico cervicovaginal.** Rio de Janeiro : Revinter, 1997.

- 108 LEHN, H. et al. Physical state and biological activity of HPV genomes in precancerous lesion of female genital tract. **J. Gen. Virol.**, London, v. 69, p.187–196, 1998.
- 109 LEVIN, M.; KRESS, L. C.; GOLDSTEIN, H. Syphilis and cancer. **N. Y. State J. Med.**, New York, v. 42, p. 1737-1745, 1942
- 110 LEVINE, A. J. et al. HPV DNA and risk of squamous intraepithelial lesion of uterine cervix in young woman. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 100, n. 1, p. 6–11, July 1993.
- 111 LEY, C. et al. Determinants of genital human papillomavirus infection young women. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 83, n. 14, p.997–1003, July 1991.
- 112 LÖRINCZ, A. et al. Oncogene association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 79, p. 671-677, 1987.
- 113 LÖRINCZ, A. T. et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 79, n. 3, p. 328–337, Mar. 1992.
- 114 LÖRINCZ, A. T. Diagnosis of human papillomavirus infection by the new generation of molecular DNA essays. **Clin. Immunol. News**, v. 12, p. 123–128, 1992.
- 115 LÖRINCZ, A. T. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 23, n.3, p. 707–730, 1996.
- 116 LÖRINCZ, A. T. Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens. **Papillomavirus Report**, v. 7, p.1-7, 1996.
- 117 LUESLEY, D. et al. Cigarette smoking and histological outcome in women with midley dyskaryotic cervical smears. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, Oxford, v. 101, n. 1, p. 49-52, Jan. 1994.
- 118 LUNGU, O. et al. Relationship of human papillomavirus type to grade of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, Chicago, v. 267, p. 2493- 2496, 1992.
- 119 MALKERT, N.; HOPMAN, E.; BLULE, A. J. C. Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by PCR, is age dependent. **Int. J. Cancer**, New York, v. 53, n. 6, p. 919–923, Apr. 1993.
- 120 MARCOS, J. B. Introdução. In: _____. **Colposcopia e patologia cervical**. São Paulo : Fundação Byk, 1997. p. 23 –37.

- 121 MARTIN, C. E. Marital and coital factors in cervical cancer. **Am. J. Public Health**, Washington, v. 57, p. 803–814, 1967.
- 122 MARTINEZ, I. Relationship of squamous cell carcinoma of cervix uterini and squamous cell carcinoma of the penis. **Cancer**, New York, v. 24, p.777-780, 1969.
- 123 MATLASHEWSKI, G. et al. Transformation of primary human fibroblast cells with HPV type 16 DNA and EJ – RAS. **Int. J. Cancer**, New York, v. 42, n. 2, p. 232–238, Aug. 1988.
- 124 MATSUURA, Y. et al. Low grade cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus infection. **Acta. Cytol.**, St. Louis, v. 42, n. 3, p.625–630, 1998.
- 125 MC GOOGAN, E.; SEAGAR, A. L.; CUBIE, H, A. Detection of high risk human papillomavirus nucleic acid in archival cervical smears. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 42, n. 5, p.1079–1083, Sep./Oct. 1998.
- 126 MEISELS, A. ; FORTIN. R. Condilomatous lesion of the cervix and vagina I: cytologyc patterns. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 20, p. 505,1976.
- 127 MEISELS, A ; FORTIN, R ; ROY, M. Condilomatous lesion of the cervix II: cytologic, colposcopic and histologic study. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 21, p. 379,1977.
- 128 MEISELS, A. et al. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 25, p.7, 1981.
- 129 MEISELS, A.; MORIN, C. Human papillomavirus and cancer of the uterine cervix. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 12, p.111, 1981.
- 130 MELNICK, J. L. Papova virus group. **Science**, Washington, v. 135, p. 1128, 1962.
- 131 MESTWERDT, G.; WESPI, H. J. Gênese e diagnóstico precoce do câncer de colo e tratamento das formas incipientes. In: _____. **Atlas de colposcopia**. 4. ed. São Paulo : Manole, 1974. p. 163-176.
- 132 MILLER, D. F. The impact of hormonal contraceptive therapy on a community and effects on cythology of the cervix. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 115, p.978, 1973.
- 133 MORRIS, M. F.; SCHOTTENFELD, D.; HONG, W.K. **Prevenção do câncer ginecológico**. Rio de Janeiro : Interlivros, 1996.

- 134 MOSCICKI, A . B. et al. Comparison between colposcopic, cytologic, and hystologic finding in women positive and negative for Human Papillomavirus DNA. **J. Adolesc. Health**, New York, v. 14 , p. 74–79, 1993.
- 135 MOSSETTI, C.; DE PALO, G. A colposcopia ontem e hoje. In: _____. **Colposcopia e patologia do trato genital inferior**. São Paulo : Médico-Científica, 1993. p. 37-64.
- 136 MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Epidemiology of cervical cancer. **IARC Sci. Publ.**, v. 94, p.9, 1989.
- 137 MUÑOZ, N. et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia grade III/ carcinoma in situ in Spain and Colombia. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Baltimore, v. 2, p. 423– 431, 1993.
- 138 MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Cervical cancer and Human Papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. **Salud Pública Méx.**, México, v. 39, n. 4, p. 274–282, 1997.
- 139 NAHMIAS, A.J.; NAIB, Z.M.; JOSEF, W. E. Epidemiological study relating genital herpetic infection to cervical carcinoma. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 34, p.1111-1117, 1974.
- 140 NASIELL, K.; NASIELL, M.; VACLAVINKOVA, V. Behavior of moderate cervical dysplasia during long term follow up. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 61, p. 609–614, 1983.
- 141 NASIELL, K.; ROGER,V.; NASIELL, M. Behavior of mild cervical dysplasia during long term follow up. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 67, p. 665–669,1986.
- 142 NATIONAL CANCER INSTITUTE WORKSHOP. The 1988 Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses. **JAMA**, Chicago, v. 262, p. 931, 1989.
- 143 NAVRATIL, E. et al. Simultaneous colposcopy and citology used in screening for carcinoma of the cervix. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 75, p. 1292, 1958.
- 144 NEGRINI, B.P. et al. Oral contraceptive use , human papillomavirus infection, and risk of early cytological abnormalities of the cervix. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 50, n. 15, p. 4670–4675, 1990.
- 145 NOBBENHUIS, M. A. E. et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study. **Lancet**, London, v. 354, p. 20-25, 1999.

- 146 OLSEN, A. O.; GJOEN, K.; SAUER, T. Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade II/III: a population based case control study. **Int. J. Cancer**, New York, v. 61, n. 3, p. 312, May 1995.
- 147 ORIEL, J. D. Natural history of genital warts. **Br. J. Vener. Dis.**, v. 47, p.1, 1971.
- 148 ORIEL, J. D. Historical Overview. In: GROSS, G.; VON KROGH, G. **Human Papillomavirus Infection in dermato venereology**. New York : C.R.C, 1997. p. 7–11,
- 149 PAAVONEN, J. et al. Genital chlamydia trachomatis infection in patients with cervical atypia. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 54, p.289 - 291, 1979.
- 150 PAPANICOLAOU, G. N.; TRAUT, H. F. **Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear**. New York : Commonwealth Fund, 1943.
- 151 PARKIN, D.M.; MUIR, C. S. Cancer incidence in five continents comparability and quality of data. **IARC Sci. Publ.**, Lyon, v. 120, p. 45 – 173, 1992.
- 152 PARRAZINI, F. et al. Barrier methods of contraception and the risk of cervical neoplasia. **Contraception**, New York, v. 40, p. 519, 1989.
- 153 PARRAZINI, F. et al. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer**, New York, v. 69, p. 2276, 1992.
- 154 PATTEN, S. F.; HUGHES, C. P.; REAGAN, J. W. An experimental study of the relationship between trichomonas vaginalis and dysplasia of the uterine cervix. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 7, p.187–190. 1963
- 155 PFISTER, H. Papillomaviruses: general description, taxonomy, and classification. In: SALZMAN, N. P. **The Papovaviridae II**. New York : Plenum, 1987. p. 1.
- 156 PFISTER, H.; WIELAND, V. Papilomavirus em patologia humana: epidemiologia, patogênese e papel oncogênico. In: GERD, E.G.; BARRASSO, R. **Infecção por papilomavirus humano: atlas clínico de HPV**. Porto Alegre : Artes Médicas Sul, 1999. p. 1-18.
- 157 PROKOPCZYK, B. et al. Identification of tobacco – specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 89, p. 868-873, 1997.
- 158 PUROLA, E.; SAVIA, E. Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 21, p.26, 1977.

- 159 RATNAM, S. et al. Utility of HPV testing in combination with Papanicolaou smear in primary cervical cancer screening. In: INTERNATIONAL PAPILLOMAVIRUS CONFERENCE (17. : 1999 : Charleston). **Abstracts**. Charleston, 1999.
- 160 REAGAN, J. W.; HICKS, D. J. The celular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hiperplasia of uterine cervix. **Cancer**, New York, v. 6, p. 224–225, 1953.
- 161 REAGAN, J. W.; HICKS, D. J. A study of in situ and squamous cell cancer of uterine cervix. **Cancer**, New York, v. 6, p. 1200, 1953.
- 162 REAGAN, J. W.; HICKS, D. J. Atypical hiperplasia of uterine cervix. **Cancer**, New York, v. 8, p. 42–52, 1955.
- 163 REEVES, W. C. et al. Case control study of human papillomavirus and cervical cancer in Latin America. **Int. J. Cancer**, New York, v. 40, n. 4, p. 450–454, Oct. 1987.
- 164 REEVES, W. C. et al. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 320, n.22, p.1437–1441, 1989.
- 165 REID, R. et al. Genital warts and cervical cancer: a colposcopic index for differentiating subclinical papillomaviral infection from cervical intraepithelial neoplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 149, n. 8, p. 815–823, 1984.
- 166 REID, R. et al. Sexually transmitted papilloviral infection. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 156, n. 1, p. 212–222, Jan. 1987.
- 167 REID, R. Biology and colposcopy of Human Papillomavirus associated cervical disease. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 20, p. 123–151, 1993.
- 168 REID, R.; LÖRINCZ, A. T. Human papillomavirus tests. **Clin. Obst. Gynecol.**, Philadelphia, v. 38, n. 1, p. 65 – 102, 1995.
- 169 RICHART, R. M. A theory of cervical carcinoma genesis. **Obstet. Gynecol. Surv.**, Baltimore, v. 24, p. 874, 1967.
- 170 RICHART, R. M. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clin. Obstet. Gynecol.**, Philadelphia, v. 10, p.748, 1967.
- 171 RICHART, R. M.; BARRON, B. A. A follow up study of patients with cervical dysplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 105, p. 386–393, 1969.

- 172 RICHART, R. M. Causes and management of cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer**, New York, v. 60, n. 8, suppl., p.1951, Oct. 1987.
- 173 RICHART, R. M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. **Obstet.Gynecol.**, New York, v. 75, p. 131, 1990.
- 174 RICHART, R. M. et al. Human papillomavirus. **Acta Cytol.**, St. Louis, v. 42, n.1, p. 50, 1998.
- 175 RIEPER, J. P.; FONSECA, N. M. Achados colposc6picos e sua interpreta77o. In: _____. **Patologia cervical: colposcopia, citologia, histologia**. S7o Paulo : Manole, 1978. p. 16-64.
- 176 RIOU, G. et al. Association between poor prognosis in early stage invasive cervical cancer and non detection of HPV DNA. **Lancet**, London, v. 335, n. 8699, p. 1171-1174, May 1990.
- 177 ROMEY, S. L. et al. Effects of β carotene and other factors on outcome of cervical dysplasia and human papillomavirus infeections. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 65, p. 483-492, 1997.
- 178 ROTELI, M. C. et al. Associa77o entre diversos tipos de DNA HPV e outras infe77o7es vaginais com les77es intra epiteliais cervicais de alto grau. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 363 – 368 ,1997.
- 179 ROTELI , M. C. et al. Cigarette smoking and high risk HPV DNA as predisposing factors for high grade cervical intraepitelial neoplasia in young Brazilian women. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, Copenhagen, v. 77, n. 6, p. 678-682, 1998.
- 180 ROTKIN, I. D. Adolescent coitus and cervical cancer: association of related events with increased risk. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 27, p. 603-617, 1967.
- 181 SCHIFFMAN, M. H. et al. Comparison of Southern Blot hybridization and polimerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, p. 573-577, 1991.
- 182 SCHIFFMAN, M. H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 84, n. 6, p. 394-398, Mar. 1992.
- 183 SCHIFFMAN, M.H. Validation of hybridization assays: correlation of filter "in situ" Dot Blot and PCR with Southern Blot. In: MU71OZ, N. et al. **The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus**. Lyon, France : International Agency for Research on Cancer, 1992. p.169-179.

- 184 SCHIFFMAN, M. H.; BAUER, H. M.; HOOVER, R. N. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 85, n. 12, p. 958, June 1993.
- 185 SCHIFFMAN, M.H. Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 186, p. 55-81, 1994.
- 186 SCHIFFMAN, M. H.; BRINTON, L. A. The epidemiology of cervical carcinogenesis. **Cancer Suppl.**, Bethesda, v. 76, n. 10, p. 1888–1901, 1995.
- 187 SCHIFFMAN, M.H. et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening. **JAMA**, Chicago, v. 283, n. 1, p. 87-93, 2000.
- 188 SCHNEIDER, A.; KOUTSKY, L. Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. In: MUÑOZ, N. et al. **The epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus**. Lyon, France : International Agency for Research on Cancer, 1992. p. 25-52.
- 189 SCHNEIDER, A. Natural history of genital papillomavirus infection. **Intervirolgy**, Basel, v. 37, p. 201-214 , 1994.
- 190 SCHWARZ, E. et al. Structure and transcription of HPV sequences in cervical carcinoma cells. **Nature**, London, v. 314, p.111, 1985.
- 191 SEDLIS, A.; COHEN, A.; SALL, S. The fate of cervical dysplasia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 107, p. 1065–1070, 1970.
- 192 SHAH, K. V. Evaluation of hybrid capture II, probe-b assay in cervical cancer screening of women in Zimbabwe, Africa. In: INTERNATIONAL PAPILLOMAVIRUS CONFERENCE (17. : 1999 : Charleston). **Abstracts**. Charleston, 1999.
- 193 SHERMAN, M. E. et. al. Towards objective quality assurance in cervical cytopathology, correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high risk HPV types. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 102, n. 2, p.182–187, Aug. 1994.
- 194 SHIROSAWA , H. et al. Detection of HPV types 16 DNA and evidence of integration into the cell DNA in cervical dysplasia. **J. Gen. Virol.**, London, v. 67, p. 2011, 1986.
- 195 SIANTURI , R. Colposcopic Index of HPV and patients. **Asia Oceania J. Obstet. Gynecol.**, v. 19, p. 127–131. 1993.

- 196 SIMONS, A. M.; PHILLIPS, D. H.; COLEMAN, D. V. Damage to DNA in cervical epithelium related to smoking tobacco. **B. M. J.**, London, v. 306, n. 6890, p. 1444–1448, May 1993.
- 197 SINGER, A.; REID, B. L. Does the male transmit cervical cancer? **Contemp. Obstet. Gynecol.**, v. 13, p. 173–180, 1979.
- 198 SMEDTS, F. et al. Keratin expression in cervical cancer. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 141, n. 2, p. 497–511, Feb. 1992.
- 199 SOUSA, R.; DOSTATNI, N.; YANIV, M. Control of papillomavirus gene repression. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 19, p. 1032, 1990.
- 200 SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragment separate by gel eletroforesis. **J. Mol. Biol.**, London, v. 98, p. 503, 1975.
- 201 STRAUSS, M. J. et al. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterised by intranuclear inclusion bodies. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Cambridge, v. 72, p. 46, 1949.
- 202 SUN, X. et al. Evaluation of the Hybrid capture Human Papillomavirus desoxiribonucleic acid detection test. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 173, n. 5, p. 1432–1437, Nov. 1995.
- 203 SWAN, D. D. et al. Human papillomavirus DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, p. 1030–1034, 1999.
- 204 SYRJÄNEN, K. et al. Sexual behavior of women with human papillomavirus lesion of the uterine cervix. **Br. J. Vener. Dis.**, v. 60, p. 243–248, 1984.
- 205 SYRJÄNEN, K. et al. Factors associated with progression of cervical Human Papillomavirus infections into carcinoma in situ during a long term prospective follow up. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, Oxford, v. 95, n. 11, p. 1096–1102, Nov. 1988.
- 206 SYRJÄNEN, K. J. Natural history of genital HPV infection. **Papillomavirus Report.**, v. 1, p.1–4, 1990.
- 207 TAROMARU, E. K.; GALLO, C.; DORES, G. B. Biologia molecular na detecção de DNA HPV: correlação entre duas gerações de Captura Híbrida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DO TRATO GENITAL INFERIOR E COLPOSCOPIA (11. : 1998 : Brasília). **Resumo de temas livres**. Brasília, 1998. p. 3.

- 208 TERRIS, W. et al. The relationship of coitus to carcinoma of the cervix. **Am. J. Public Health**, Washington, v. 57, p. 840–847, 1967.
- 209 THIERRY, F. HPV proteins in the control of HPV transcription. In: LACEY, C. **Papillomavirus Reviews** : current research on Papillomavirus. New York : Leeds University, 1996. p. 21 - 29.
- 210 THOMAS, D. B. Relationship of oral contraceptive to cervical carcinogenesis. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 40, p. 508, 1972.
- 211 TROFATTER Jr., K. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infections. **Am. J. Med.**, New York, v. 102, n. 1, p. 21–27, Jan. 1997.
- 212 VESSEY, M. P. et al. Neoplasia of the cervix and contraception: a possible adverse effect of the pill. **Lancet**, v. 2, p. 930 – 934, 1983.
- 213 VIRTEJ, P. et al. Cervical intraepithelial neoplasia and HPV infection. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, Padua, v. 2, p. 179-181, 1998.
- 214 VOUSDEN, K. H.; WREDE, D.; CROOK, T. HPV oncoprotein function: releasing the brakes on cell growth control. **Papillomavirus Report**, v. 2, p.1–3, 1991.
- 215 WAGNER, D. et al. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. **Lancet**, v. 1, n. 8526, p. 703 – 706, 1987.
- 216 WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 48, n. 8, p. 728–732, Aug. 1995.
- 217 WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, Chichester, v. 189, p. 12-19, 1999.
- 218 WALKER, J. et al. Human papillomavirus genotypes as a prognostic indicator in carcinoma of cervix uterine. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 74, p. 781–785, 1989.
- 219 WERNESS, B. A. ; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. Association of HPV types 16 and 18 E6 proteins with P53. **Science**, Washington, v. 248, p.76–79, 1990.
- 220 WESPI, H. **Early carcinoma of the uterine cervix: patogenesis and detection**. New York : Grune and Stratton, 1949.

- 221 WICKENDEN, C. et al. Prevalence of HPV DNA and viral copy numbers in cervical scrapes from women with normal and abnormal cervixes. **J. Pathol.**, Chichester, v. 153, n. 2, p.127-135, Oct. 1987.
- 222 WIELAND, V.; PFISTER, H. Molecular diagnosis of persistente Human Papilloma Virus infections. **Intervirol.**, Basel, v. 39, p. 145–157, 1996.
- 223 WILCZYNSKI, S. P. et al. Human papillomaviruses and cervical cancer: analisis of histopathologic features associated with differents viral types. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 19, n. 6, p. 697–704, June 1988.
- 224 WILKENSTEIN, W. Smoking and cervical cancer: current status. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v. 131, n. 6, p. 945, June 1990.
- 225 WOMACK, S. D. et al. Evaluation of a human papillomavirus assay in cervical screening in Zimbabwe. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, Oxford, v. 107, p. 33–38, 2000.
- 226 WOODMAN, C. B. J. et al. HPV infection and risk of progession of epithelial abnormalities of the cervix. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 73, p. 553–556, 1996.
- 227 WORTH, A. J.; BOYES, D. J. A case control study into the possible effects of birth control pills on preclinical carcinoma of the cervix. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, Oxford, v. 79, p. 673, 1972.
- 228 WRIGHT, T. C.; SUN, X. W.; KOULOS, J. Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low grade cytologic abnormalities. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 85, n. 2, p. 202–210, Feb. 1995.
- 229 ZAHM, D. M.; NINDL, I.; SCHNEIDER, A. Princípios gerais do diagnóstico: detecção do Papilomavírus humano. In: GROSS, G. E.; BARRASSO, R. **Infecção por papilomavírus humano**. Porto Alegre : Artes Médicas Sul, 1999. p.19 – 45.
- 230 ZÜR HAUSEN, H. et.al. Attempts to detect acid hybridizations with complementary RNA of human warts virus. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 13, p. 650, 1974.
- 231 ZÜR HAUSEN, H. Condyloma accuminatta and human genital cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 36, p. 530, 1976.
- 232 ZÜR HAUSEN, H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinoma. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 48, p. 1-30, 1977.
- 233 ZÜR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancer. **Mol.Carcinog.**, New York, v. 1, p. 147–150, 1988.

- 234 ZÜR HAUSEN, H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. **Virology**, New York, v. 184, p. 9–13, 1991.
- 235 ZÜR HAUSEN, H. Human pathogenic papillomaviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 186, p. 634, 1994.